



Recherche de facteurs génétiques intervenant dans la variabilité de la réponse aux opioïdes dans le traitement de la douleur et les traitements de substitution

Aline Hajj

► To cite this version:

Aline Hajj. Recherche de facteurs génétiques intervenant dans la variabilité de la réponse aux opioïdes dans le traitement de la douleur et les traitements de substitution. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2012. Français. NNT : 2012PA05P617 . tel-00750878

HAL Id: tel-00750878

<https://theses.hal.science/tel-00750878>

Submitted on 12 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES -PARIS- FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE MÉDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE ENVIRONNEMENT

UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH -BEYROUTH- LIBAN
FACULTÉ DE PHARMACIE

Thèse pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS DESCARTES
ET DE L'UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH

Disciplines : Pharmacologie-Biologie cellulaire
Présentée et soutenue publiquement le 15 Mai 2012 par

Aline HAJJ

**RECHERCHE DE FACTEURS GÉNÉTIQUES
INTERVENANT DANS LA VARIABILITÉ DE LA
RÉPONSE AUX OPIOÏDES DANS LE TRAITEMENT DE
LA DOULEUR ET LES TRAITEMENTS DE
SUBSTITUTION**

Monsieur le Professeur Pierre Marquet, rapporteur

Madame le Docteur Isabelle Djaffar-Jureidini, rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-Michel Scherrmann, examinateur

Madame le Professeur Dolla Karam Sarkis, examinateur

Madame le Professeur Lydia Rabbaa Khabbaz, directeur de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Louis Laplanche, directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Arrivée au terme de cette thèse, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui, par leur enseignement, leur soutien et leurs conseils, m'ont aidée à sa réalisation.

Je tiens à remercier d'abord Monsieur le Professeur Pierre Marquet et Madame le Docteur Isabelle Djaffar Jureidini qui ont accepté la charge d'être rapporteurs et qui m'ont permis par leurs remarques et suggestions d'apporter de nouveaux éclairages à ce travail.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur Jean-Michel Scherrmann qui m'a honorée de sa confiance en acceptant de m'accueillir au sein de son unité de recherche et en acceptant d'être le président de mon jury de thèse.

Mes sincères remerciements à ma Doyenne, Professeur Dolla Karam Sarkis qui m'a encouragé à entreprendre des activités de recherche au sein de la faculté de Pharmacie de Beyrouth et qui m'a soutenu tout au long de ces années d'études. Puissent ces lignes être l'expression de ma plus profonde reconnaissance. Merci également d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements sont également adressés à Monsieur le Professeur Jean-Marie Launay, chef du service de Biochimie et Biologie moléculaire de l'Hôpital Lariboisière à Paris pour m'avoir permis de conduire une partie de mes travaux au sein de son service.

Je remercie mes directeurs de thèse, Monsieur le Professeur Jean Louis Laplanche et Madame le Professeur Lydia Khabbaz Rabbah qui m'ont permis de poursuivre mon travail de recherche dans un esprit scientifique rigoureux. Leur écoute attentive et ininterrompue, ainsi que leurs vastes connaissances et leurs conseils avisés en matière de biologie moléculaire et de pharmacologie m'ont été d'une aide précieuse. Je leur adresse toute ma gratitude.

Toute ma reconnaissance va également au Docteur Katell Peoc'h, co-directrice de la thèse, pour sa disponibilité incessante, ses conseils rigoureux et son sens critique. Merci à tout le temps consacré pour ma formation mais également à ses multiples relectures et ses précieuses corrections.

Je remercie tous les membres de l'unité INSERM U705 ; CNRS UMR 8206 et des services de Biochimie et de Toxicologie de l'Hôpital Lariboisière ainsi que mes collègues de la faculté de pharmacie de Beyrouth pour leur soutien amical et leur encouragement.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Professeur Jacques Callebert qui m'a initié à la technique complexe de dHPLC et le Docteur Emmanuel Curis qui m'a apporté son aide dans le choix le plus approprié des méthodes statistiques et dans l'analyse des résultats obtenus.

Je remercie également le Docteur Nicolas Tournier qui m'a aidé dans la réalisation des procédures expérimentales de la partie cellulaire.

Par ailleurs, ce travail a été rendu possible grâce aux soutiens financiers du Conseil de la recherche de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth et la bourse d'excellence Eiffel.

Enfin, au terme de ces remerciements, je souhaiterai rendre hommage aux membres de ma famille, et en particulier à maman, à mon frère Georges et ma sœur Layal pour leur soutien incommensurable tout au long de mes études et pour tout ce qu'ils m'apportent au quotidien.

SOMMAIRE

RECHERCHE DE FACTEURS GÉNÉTIQUES INTERVENANT DANS LA VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE AUX OPIOÏDES DANS LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR ET LES TRAITEMENTS DE SUBSTITUTION	1
REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
INTRODUCTION GENERALE	12
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	16
I- LES OPIOÏDES	16
I.1- INTRODUCTION	16
I.2- PEPTIDES OPIOÏDES ENDOGENES	17
I.3- AGONISTES ET ANTAGONISTES	17
I.4- RECEPTEURS	20
I.5- EFFETS DES AGONISTES OPIOÏDES	23
I.6- TOXICITE ET EFFETS INDESIRABLES	25
II- DOULEUR ET SON TRAITEMENT	26
II.1- DEFINITION ET CIRCUITS DE LA DOULEUR	26
II.2- DOULEURS AIGUES ET CHRONIQUES	28
II.3- PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR : TRAITEMENT ANTALGIQUE	29
II.4- PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR PAR EXCES DE NOCICEPTION : PLACE DE LA MORPHINE	31
III- DEPENDANCE AUX OPIOÏDES ET SON TRAITEMENT	37
III.1- HISTOIRE DE LA MALADIE	37
III.2- ADDICTIONS AUX OPIACES	37
III.3- COMPLICATIONS	39
III.4- MECANISMES MOLECULAIRES ET NEUROBIOLOGIQUES DE LA TOLERANCE ET DE LA DEPENDANCE : IMPLICATION DU SYSTEME DE RECOMPENSE	40
III.5- TRAITEMENTS DE SUBSTITUTION : LA METHADONE	42
IV- FACTEURS DE VARIABILITE DE LA REPONSE AUX OPIOÏDES	50
IV.I- INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES	50

IV.2- PHARMACOGENETIQUE DE LA MORPHINE ET DE LA METHADONE	56
TRAVAIL EXPERIMENTAL	67
▶ OBJECTIFS GENERAUX DU TRAVAIL EXPERIMENTAL	67
I- VARIABILITE DE LA REPONSE A LA MORPHINE	68
I.1- VARIABILITE DE LA REPONSE A LA MORPHINE EN PERIODE POSTOPERATOIRE– RECHERCHE DE L'IMPLICATION DE FACTEURS GENETIQUES	69
I.2- PHARMACOGENETIQUE DES OPIACES CHEZ LES PATIENTS OBESES	88
II- VARIABILITE DE LA REPONSE A LA METHADONE	91
II.1- INTRODUCTION	91
II.2- PHARMACOGENETIQUE DE LA REPONSE A LA METHADONE	92
II.3- INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES IMPLIQUANT LA METHADONE : MISE EN PLACE D'UN MODELE <i>IN VITRO</i> (EVALUATION DE L'INTERACTION METHADONE-DULOXETINE)	124
II.4- EVALUATION DES FACTEURS GENETIQUES IMPLIQUES DANS LES EFFETS SECONDAIRES CARDIAQUES DE LA METHADONE	129
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149
ANNEXES	166

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>ABCB1</i>	Gène codant pour ATP Binding Cassette, sous-famille B, membre 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMM	Autorisation de mise sur le marché
BED	Troubles du comportement alimentaire (<i>Binge eating disorder</i>)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BZD	Benzodiazépines
CépiDc	Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès de l'INSERM
CI50	Concentration inhibitrice à 50%
CNV	Nombre de copies de gènes (<i>Copy number variation</i>)
COMT	Catéchol-O-méthyl-transférase (gène et protéine)
CPP	Comité de protection des personnes
CYP	Cytochrome P450
DBH	Dopamine-β-hydroxylase
dHPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase dénaturante
DI-LQT	Allongement du QT induit par les médicaments (<i>Drug induced QT-prolongation</i>)
dATP	Désoxy adénine tri-phosphate
dCTP	Désoxy cytosine tri-phosphate
dGTP	Désoxy guanine tri-phosphate
dTTP	Désoxy thymine tri-phosphate
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides cités plus haut
DRAMES	Décès en relation avec l'abus de médicaments et de substances
DRC	Délégation régionale à la recherche clinique
DRD2	Récepteur dopaminergique D2 (gène et protéine)
DSM-IV	Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux, 4ème édition
ECG	Electrocardiogramme
ECPA	Echelle comportementale d'évaluation de la douleur chez la personne âgée
EDDP	2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine
EMA	Agence européenne des médicaments (<i>European Medicines Evaluation Agency</i>)
EMDP	2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrrolidine
ENNS	Etude nationale nutrition santé
EVA	Echelle visuelle analogique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FDA	Office de contrôle des produits pharmaceutiques et alimentaires américain (<i>Food and drug administration</i>)
FMN	Flavine mononucléotide
GABA	Acide gamma amino-butyrique
GTP	Guanosine triphosphate
hERG	Canal potassique <i>Human ether-à-gogo</i>
hMOR	Récepteur opioïde Mu humain (protéine)
IMC	Indice de masse corporelle

INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IV	Intraveineuse
<i>KCNE1/ KCNE2</i>	Gènes du canal potassique voltage-dépendant (famille relié à Isk, membre 1 et 2)
<i>KCNH2</i>	Gène du canal potassique voltage-dépendant (sous famille H-reliée à eag-, membre 2)
<i>KCNQ1</i>	Gène du canal potassique voltage-dépendant (sous famille KQT, membre 1)
LC-MS	Chromatographie liquide-spectrophotométrie de masse
KW	Test de Kruskal Wallis
MAO	Monoamine oxydase
MILDT	Mission interministérielle de lutte contre les drogues et la toxicomanie
<i>MDR1</i>	Gène codant pour la P-glycoprotéine (<i>Multi-drug resistance protein</i>)
MW	Test de Mann Whitney
MMS	Echelle d'évaluation <i>Mini mental state</i>
MPTP	N-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MOR	Récepteur opioïde Mu (protéine)
M3G	Morphine-3-glucuronide
M6G	Morphine-6-glucuronide
NAc	Noyau accumbens
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NS	Différence statistiquement non significative
Obepi	Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité
OEDT	Observatoire européen des drogues et des toxicomanies
OFDT	Observatoire français des drogues et des toxicomanies
OMS	Organisation mondiale de la santé
<i>OPRM1</i>	Gène du récepteur opioïde Mu
OST	Optimisation des stratégies thérapeutiques
PCA	Analgésie contrôlée par le patient
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PD	Pharmacodynamie
P-gp	P-glycoprotéine
PK	Pharmacocinétique
POMC	Pro-opiomélanocortine
POR	P450 oxydo-réductase
PPSI	Potentiel postsynaptique inhibiteur
QT	Intervalle QT
QTc	Intervalle QT corrigé à la fréquence cardiaque
RM	Rapport métabolique
<i>SCN5A</i>	Gène du canal sodique voltage-dépendant (type V, sous-unité alpha)
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNP	Polymorphisme nucléotidique (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
Tdp	Torsades de pointes
Tm	Température de fusion
T _{1/2}	Temps de demi-vie

UGT	UDP-glucuronyltransférase
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VTA	Aire tegmentale ventrale
6-MAM	6-monoacétylmorphine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Papaver somniferum</i> ; (A et C) Sommités florales, (B) Fruit (pavot).	16
Figure 2 : Représentation schématique de l'analogie entre la morphine et les enképhalines endogènes.	18
Figure 3: Représentation schématique du récepteur μ et de l'interaction avec la protéine G.....	21
Figure 4: Représentation schématique de l'effet pré-synaptique des trois types de récepteurs et l'action post-synaptique du récepteur μ	21
Figure 5 : Représentation schématique de l'activation du système dopaminergique suite à la stimulation des récepteurs opioïdes μ	22
Figure 6: Représentation schématique des circuits de la douleur et des sites d'action des analgésiques opioïdes. 28	
Figure 7: Représentation schématique du métabolisme de la morphine et de l'activité des métabolites.	34
Figure 8: Mécanisme neurobiologique du comportement addictif.....	41
Figure 9: Correspondance entre le potentiel d'action, l'espace QT à l'ECG et les effets des principaux canaux ioniques.....	49
Figure 10: Localisation subcellulaire de la P-gp au niveau des entérocytes (A) et au niveau de la BHE (B).	51
Figure 11: Représentation schématique du gène OPRM1 (en haut) et du récepteur μ	61
Figure 12: Cascade du métabolisme des catécholamines au niveau central.	65
Figure 13: Génotypage du SNP c.C3435T d'ABCB1 à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques.....	73
Figure 14: Variabilité des doses de morphine permettant une analgésie efficace à 24 h pour les 44 patients inclus dans notre étude (représentation en classes de doses).	78
Figure 15 :	80
(A): Représentation schématique du gène OPRM1 et des variants d'épissage décrits chez l'homme.	80
(B): Profil obtenu par dHPLC pour l'exon3 d'OPRM1 pour un patient présentant le variant rs79216711 (tracé rouge) à l'état hétérozygote.	80
Le tracé obtenu pour un patient ne présentant pas le variant (tracé bleu) est superposé.	80
(C): Séquences de l'exon 3 d'OPRM1 obtenues pour le patient hétérozygote pour le variant rs79216711 (en encadré). Alignement sur Seqscape, en haut la séquence antisens, en bas la séquence sens.	80
Figure 16 : Conservation de la thréonine en position 14 à travers 13 espèces examinées (Logiciel Alamut).	81
Figure 17: Diagramme des inclusions de l'étude METHADOSE.....	96
Figure 18: Représentation graphique des résultats de génotypage du SNP c.3435C>T d'ABCB1 après analyse par le logiciel StepOne	98
Figure 19: Variabilité des doses de méthadone à l'équilibre thérapeutique chez les patients répondeurs (A) et celle des patients non répondeurs (B) inclus dans notre étude.....	104
Figure 20 : Absence de corrélation entre la dose de méthadone à l'équilibre et le RM (Test de Spearman).	108
Figure 21 :	108
(A) RM à 30 min en fonction de la prise concomitante de BZD (groupe consommateur BZD+, non consommateur BZD -) ;	108
(B) RM à 4 h en fonction du statut VIH (patients VIH+ et patients VIH-).	108
Figure 22: RM à 4 h pour les trois génotypes du SNP c.189-6049 G>A (rs7804806) de POR.	108
Figure 23: Analyse du nombre de copies de gène d'un patient sans modification du nombre de copie de gènes par rapport à la RNase P (nombre estimé à 2).	109
Figure 24: Représentation schématique de la structure du gène POR et de la localisation du SNP significativement associé au test au midazolam oral.	115
Figure 25 : Représentation schématique de la relation entre P450 oxydo-réductase (POR) et le CYP3A4.	116
Figure 26 : Modèle cellulaire d'étude de l'interaction entre la duloxétine et la méthadone.	126

Figure 27 : Rapports de concentrations de méthadone du compartiment apical (A) sur celles du compartiment basolatéral (B). Les écarts types sont représentés par les segments.....	127
Figure 28: Inclusions de l'étude d'association de la méthadone avec le risque d'allongement du QTc.	133
Figure 29 : Représentation schématisée des canaux sodiques et potassiques cardiaques et de certains de leurs SNPs.	133
Figure 30 : Valeurs individuelles du QTc chez les patients en fonction du sexe.	134
Figure 31: Interaction entre les domaines C- et N- terminaux du canal potassique hERG.	140
Figure 32 : Hypothèse de l'effet du SNP p.Lys897Thr de KCNH2 sur le canal potassique hERG en présence de méthadone	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification et structure chimique des peptides opioïdes endogènes.	17
Tableau 2: Classification chimique et pharmacologique de certains opioïdes utilisés en thérapeutique ou en toxicomanie.	19
Tableau 3: Caractérisation des différents types de récepteurs opioïdes.	20
Tableau 4: Principales caractéristiques des douleurs aiguës et chroniques.	29
Tableau 5: Classification de l'OMS : Paliers de la douleur et antalgiques.	31
Tableau 6: Paramètres pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme.	32
Tableau 7: Paramètres pharmacocinétiques de la méthadone chez l'homme.	45
Tableau 8: Principales études évaluant ex vivo sur des microsomes hépatiques humains les cytochromes impliqués dans le métabolisme de la méthadone.	46
Tableau 9: Facteurs de risques d'allongement du QT sous méthadone.	48
Tableau 10: Principaux inhibiteurs et inducteurs enzymatiques du CYP3A4.	53
Tableau 11: Principaux inhibiteurs et inducteurs enzymatiques du CYP2D6.	54
Tableau 12: Principales études évaluant in vivo les cytochromes impliqués dans le métabolisme de la méthadone.	60
Tableau 13: Principales études évaluant le rôle du SNP c.118A>G d'OPRM1 dans la douleur et le traitement par la morphine.	63
Tableau 14: Echelles d'évaluation de la sédation et de l'intensité des nausées sous morphine.	71
Tableau 15 : Conditions d'amplification et des courbes de fusion pour le génotypage de OPRM1, ABCB1 et COMT.	73
Tableau 16: Conditions d'amplification par PCR d'OPRM1, ABCB1 et COMT	75
Tableau 17: Données démographiques et cliniques des patients.	77
Tableau 18: Fréquences alléliques et génotypiques (%) pour les SNPs étudiés chez les patients.	79
Tableau 19: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les doses de morphine (mg) à 24 et 48 h.	82
Tableau 20: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les scores de sédation à 24 et 48 h.	84
Tableau 21: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les scores de nausée à 24 et 48 h.	84
Tableau 22: Liste des SNPs étudiés par PCR en temps réel dans le cadre de ce projet	98
Tableau 23 : SNPs du CYP3A4, CYP3A5 et POR génotypes par microarrays.	101
Tableau 24: Données démographiques et cliniques des patients.	103
Tableau 25 : Fréquences alléliques et génotypiques (%) pour les SNPs étudiés chez les patients répondeurs et non répondeurs.	106
Tableau 26: Association entre les SNPs étudiés et les doses actuelles et maximales de méthadone (mg/j).	111

Tableau 27: Relation entre les SNPs étudiés et les concentrations plasmatiques résiduelles (ng/mL) rapportées aux doses. -----	112
Tableau 28: Etudes de pharmacogénétique dans des cohortes de patients traités par la méthadone ; comparaison avec nos résultats.-----	120
Tableau 29 : Valeurs seuils de l'allongement du QTc (ms) en fonction du sexe chez l'adulte. -----	130
Tableau 30: Liste des SNPs étudiés pour l'allongement du QTc chez les patients sous méthadone. -----	133
Tableau 31: Etude d'association entre les génotypes des SNPs des canaux cardiaques et la durée du QTc chez 82 patients caucasiens traités par la méthadone-----	137
Tableau 32: Facteurs associés à l'intervalle QTc dans le modèle de régression linéaire.-----	137
Tableau 33 : Fréquences alléliques et génotypiques du SNP p.Lys897Thr dans différentes populations; comparaison à nos résultats.-----	142

INTRODUCTION GENERALE

Le système opioïde joue un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier dans l'analgésie mais également dans la réponse au stress ou la régulation du système de récompense (Mague 2010). Les opioïdes regroupent les peptides opioïdes endogènes, les opiacés (dérivés des alcaloïdes de l'opium, essentiellement héroïne et morphine), ainsi que des composés synthétiques (telle que la méthadone et la buprénorphine) qui ont des effets similaires.

La majorité des dérivés opioïdes sont des agonistes du récepteur opioïde Mu, et sont les antalgiques les plus utilisés dans le contrôle de la douleur aiguë modérée à sévère (notamment en postopératoire) et chronique (douleurs cancéreuses et non cancéreuses). Plus de 10 millions de patients cancéreux reçoivent de la morphine dans le monde. A côté de leur usage thérapeutique, les opiacés sont également impliqués dans des mésusages, associés à une dépendance aux opiacés, en particulier à l'héroïne, qui constitue un véritable problème de santé publique. Le traitement de ces mésusages repose sur un traitement de substitution, fondé sur l'administration d'agonistes opioïdes de synthèse faiblement euphorisants, qui permettent d'éviter, chez ces patients, le syndrome de manque et la recherche compulsive de produits stupéfiants. Les produits les plus utilisés sont la buprénorphine et la méthadone, par voie orale, avec à ce jour environ 670 000 personnes européennes substituées (Rapport OEDT 2010).

Les opioïdes sont des médicaments à marge thérapeutique étroite pour lesquels il existe une très grande variabilité interindividuelle de la réponse au traitement; il est difficile de déterminer la dose qui permet d'éviter l'inefficacité thérapeutique par sous-dosage ou l'apparition d'effets secondaires graves par surdosage. Ainsi, les auteurs estiment que 10 à 30% des patients traités par la morphine pour le contrôle de la douleur ressentent leur analgésie comme inefficace (Cherny 2001, Wu HL 2011), soit parce que les doses administrées sont insuffisantes pour atténuer convenablement la douleur, soit parce qu'ils ressentent des effets indésirables très importants (Klepstad 2005, Klepstad 2011). De plus, en dépit de la présence de traitements de substitution à l'efficacité établie, les études rapportent entre 30 et 80% de mauvais répondeurs au traitement, attestés essentiellement par le retrait des programmes de substitution et/ou la poursuite de consommation de drogues illicites (Bell 2006, Goldstein 2002, Johnson 2000,

Termorshuizen 2005, *United States General Accounting Office*-1990). Les doses nécessaires pour une substitution efficace sont également très variables.

La variabilité observée résulte d'une interaction complexe entre de nombreux facteurs environnementaux, pharmacologiques et génétiques. Elle peut être en partie expliquée par différents facteurs physiopathologiques comme l'âge, le sexe, la grossesse, les pathologies associées, les fonctions hépatique et rénale des patients, mais également l'alimentation, la co-administration de médicaments, le tabagisme et la pollution. Cependant, ces différents facteurs ne permettent pas de prédire totalement la variabilité de la réponse aux opioïdes (Beaune 2007).

La pharmacogénétique étudie l'effet de variants génétiques en relation avec la réponse aux médicaments. Son objectif est de permettre d'adapter le traitement en fonction du statut génétique des patients. Des variations (polymorphismes ou mutations) affectant les gènes codant des protéines impliquées dans la distribution des médicaments, leur métabolisme ou codant leur(s) cible(s) thérapeutique(s), représentent une cause importante des variations d'efficacité et de tolérance des médicaments (Somogyi 2007, Mague 2010).

La codéine est un opiacé qui illustre parfaitement l'intérêt de cette approche pharmacogénétique. En effet, des dépressions respiratoires et des décès ont été rapportés chez des nourrissons allaités par des mères «métaboliseurs ultra-rapides» de la codéine (Koren 2006, Madadi 2007, Ferner 2008, Madadi 2009). La première alerte a été publiée en 2006 par Koren et al. ; elle rapportait le décès d'un nourrisson âgé de 13 jours par surdosage morphinique (Koren 2006). La mère était traitée par des doses usuelles de codéine pour les douleurs du postpartum (épisiotomie). Les examens sanguins ont révélé des taux de morphine très importants dans le sang de l'enfant et les tests génétiques ont révélé que la mère avait le profil métaboliseur ultra-rapide pour le CYP2D6. Ainsi, elle métabolisait plus rapidement la codéine en morphine, ce qui a entraîné des taux très importants de morphine au niveau du lait maternel à l'origine du décès. Cette description a été à la base de la recommandation de l'office de contrôle des produits pharmaceutiques et alimentaires américain (*US Food and Drug Administration* -FDA) émise en 2007, qui recommande que les médecins prescrivent la codéine à la dose minimale efficace pendant la plus courte durée possible en cas d'allaitement, et qu'ils effectuent un génotypage de *CYP2D6* de la mère allaitante. Par la suite, de nombreuses autres

sociétés ont proposé l'introduction de cet outil pharmacogénétique dans la prévention des effets indésirables graves potentiellement fatals chez le nouveau né et le nourrisson lors de l'allaitement (Madadi 2009, 2011).

Ainsi, **l'administration de médicaments à marge thérapeutique étroite peut nécessiter de connaître les réponses cliniques en fonction des caractéristiques génétiques individuelles, et d'identifier des marqueurs phénotypiques et génotypiques permettant d'adapter *a priori* les doses en fonction des profils individuels des patients.** Cette individualisation du traitement par les opiacés permettrait de réduire le temps nécessaire à la mise en place d'un traitement efficace avec le minimum de complications et d'effets secondaires.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés en cotutelle entre l'Université Saint-Joseph (Beyrouth, Liban) et l'Université Paris Descartes (Paris, France). Ils ont été financés par la bourse d'excellence Eiffel (Ministère des affaires étrangères, France) et le Conseil de la recherche de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth (Liban).

L'objectif général de ce travail a été d'examiner si des facteurs de variabilité interindividuelle de la réponse thérapeutique pouvaient être mis en évidence chez des patients traités par les opioïdes dans des contextes différents, cliniques et ethniques. L'originalité de notre travail réside dans l'exploration des caractéristiques pharmacogénétiques des populations libanaise et française traités par les opioïdes, en vue de leur confrontation aux données controversées observées dans d'autres populations ethniques.

Dans le cadre de ces travaux de recherche, j'ai été amenée à mettre au point des techniques de génotypage appliquées à des gènes qui n'étaient pas étudiés jusqu'à présent dans les laboratoires d'accueil français et libanais et à les adapter à chaque site en fonction du parc instrumental. Les techniques suivantes ont été utilisées : génotypage par PCR conventionnelle couplée à la Chromatographie liquide haute performance en phase dénaturante (dHPLC), à la restriction enzymatique et au séquençage, génotypage par PCR en temps réel, détermination du nombre de copies de gènes. Une fois cette phase de mise au point réalisée, j'ai procédé dans un deuxième temps, au génotypage des patients inclus progressivement dans les protocoles de recherche clinique, dont un que j'ai pu mettre en place au Liban. Enfin, j'ai collecté l'ensemble

des données cliniques, génétiques, pharmacocinétiques et biologiques afin de procéder à l'analyse statistique des résultats et pouvoir les interpréter.

Ce manuscrit est organisé en deux grandes parties :

- Dans le premier volet de mon travail de thèse, je me suis intéressée à la **recherche de facteurs génétiques influençant la réponse à la morphine** dans le traitement de la **douleur** aiguë et chez des patients présentant une **obésité** morbide.
- Dans le second volet, j'ai recherché des **facteurs influençant la variabilité de la réponse à la méthadone** chez des patients toxicomanes traités pour substitution, ainsi qu'à l'étude de **facteurs génétiques associés aux effets indésirables** cardiaques de la méthadone.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I- LES OPIOÏDES

I.1- INTRODUCTION

L'opium est extrait du pavot à opium, *Papaver somniferum* (figure 1). Utilisé depuis au moins 6000 ans, des traces de son utilisation sont retrouvées dans des documents égyptiens, grecs, romains et chinois. Ce n'est qu'au XVIII^{ème} siècle que le potentiel toxicomanogène de l'opium commença à susciter de l'inquiétude.



Figure 1: *Papaver somniferum* ; (A et C) Sommités florales, (B) Fruit (pavot).

La base moderne de la pharmacologie de l'opium a été établie par Sertürner, un pharmacien allemand, qui isola une substance alcaline active pure de l'opium en 1806. Ce fut un événement marquant dans la mesure où il fut le premier à isoler un principe actif d'une herbe ou d'une plante médicinale (produit naturel) et à lui attribuer des vertus thérapeutiques. Sertürner proposa le nom de « morphine » d'après le nom de la divinité grecque des rêves, Morphée (Μορφεύς) (Goodman 2011). La morphine est ainsi l'un des constituants purifiés de l'opium. Le terme de dérivés opioïdes regroupe tous les alcaloïdes naturels et semi-synthétiques dérivés de l'opium aussi bien que leurs substituts synthétiques dont les actions miment celles de la morphine. Parmi les opioïdes, on retrouve les opiacés (dérivés des alcaloïdes de l'opium, tels que la morphine), des composés synthétiques (tels que la méthadone) qui ont des structures assez différentes mais des effets similaires, des agonistes-

antagonistes (tel que la buprénorphine) et les peptides opioïdes endogènes (telles la β -endorphine, les dynorphines et les enképhalines).

I.2- PEPTIDES OPIOÏDES ENDOGENES

Trois grandes familles d'opioïdes endogènes ont été identifiées à ce jour, dérivant chacune d'un précurseur. Les principaux opioïdes endogènes ainsi que leurs structures sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Classification et structure chimique des peptides opioïdes endogènes.
(adapté de Goodman 2011)

1- Dérivés de la proenképhaline	
Met-enképhaline	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu-enképhaline	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
2- Dérivés de la prodynorphine	
α -néo-endorphine	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Pro-Lys
β -néo-endorphine	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
Dynorphine A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dynorphine B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
3- Dérivés de la POMC (pro-opiomélanocortine)	
β -endorphine	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu

Les différences structurales entre tous ces peptides confèrent à ces molécules des affinités différentes pour les trois sous-types de récepteurs opioïdiques (*cf. paragraphe 1.4- Récepteurs ; tableau 3*). Ces peptides endogènes et leurs précurseurs sont retrouvés à différents niveaux du SNC et ont été impliqués dans la modulation de la douleur.

I.3- AGONISTES ET ANTAGONISTES

La morphine est considérée comme l'agoniste type des récepteurs opioïdes. Les dérivés de l'opium sont des alcaloïdes à structure analogue aux enképhalines endogènes. Un certain

nombre de pharmacophores sont responsables de l'activité analgésique (figure 2). Des modifications moléculaires mineures peuvent changer de façon spectaculaire l'action de ces composés. Ainsi, des substitutions sur les groupements hydroxyles en C3 ou en C6 de la morphine modifient notablement les propriétés pharmacocinétiques. Par exemple, une substitution du groupement hydroxyphénolique en C3 réduit la sensibilité de la molécule à une inactivation par glucuroconjugaison lors d'un premier passage hépatique. De ce fait, des médicaments tels que la codéine (méthylmorphine) et l'oxycodone, ont un rapport élevé d'activité voie orale/voie parentérale. L'acétylation des deux groupements hydroxyles de la morphine aboutit à l'héroïne (diacétylmorphine, acétylation en positions 3 et 6) très liposoluble, qui traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) beaucoup plus rapidement que la morphine. Le blocage de l'hydroxyl phénolique en position 3, tels que dans les molécules de codéine et de morphine, réduit considérablement la fixation au niveau des récepteurs. Ainsi, ces deux molécules sont converties *in vivo* en morphine et 6-monoacétylmorphine (6-MAM) respectivement, beaucoup plus actives que les molécules mères (Coller 2009, Katzung 2009, Goodman 2011).

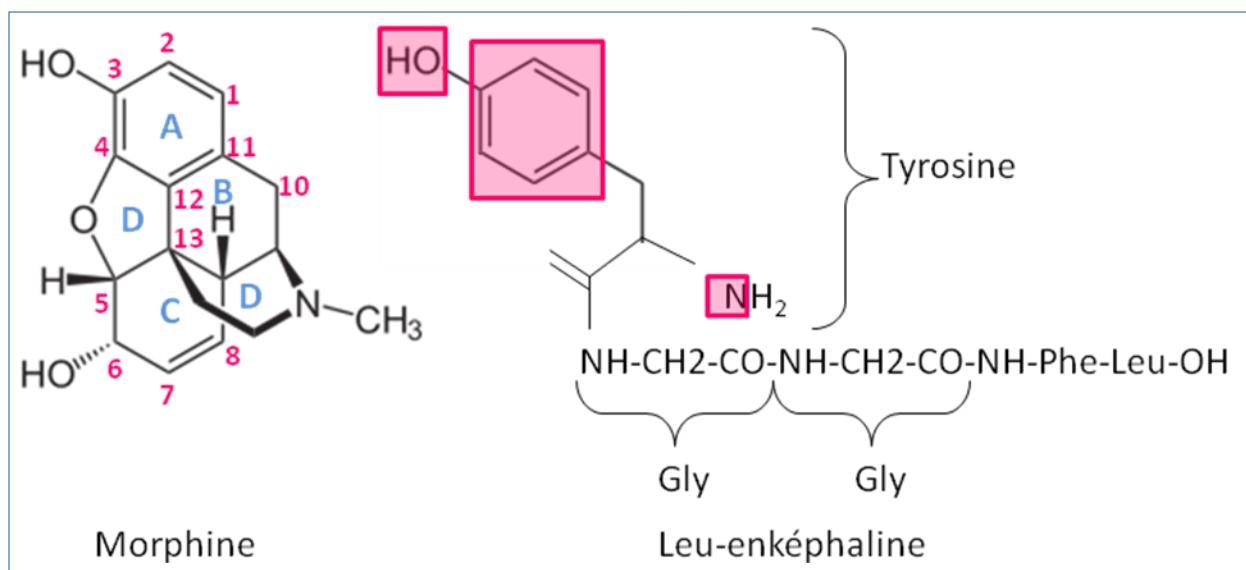

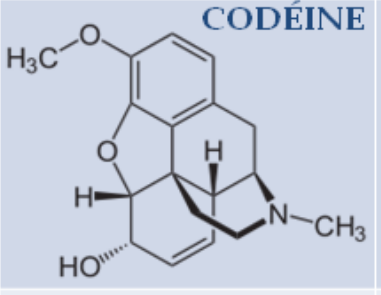
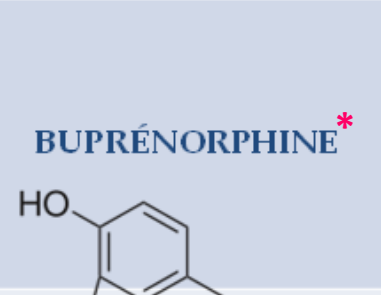
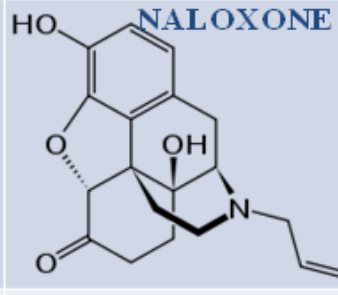
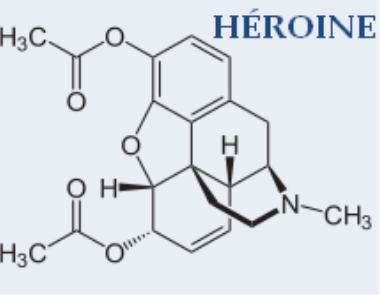
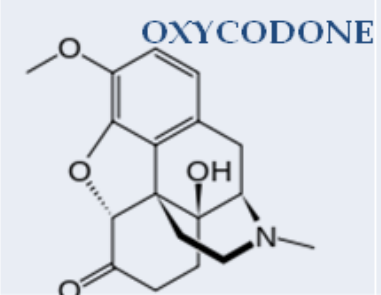
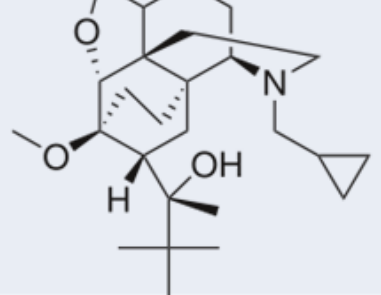

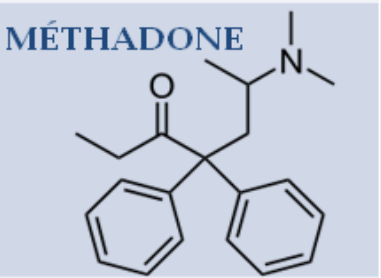
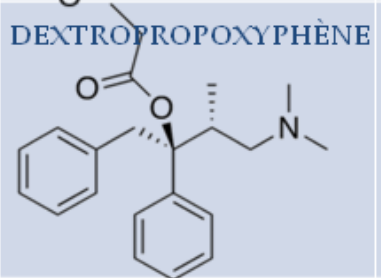
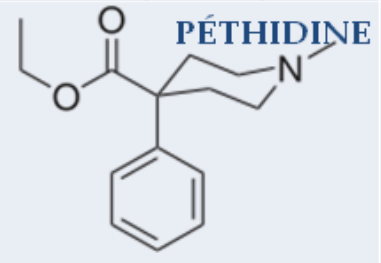


Figure 2 : Représentation schématique de l'analogie entre la morphine et les enképhalines endogènes.
Les pharmacophores sont encadrés en rose : l'hydroxyle (OH) en position 3, le cycle aromatique en A et l'azote.

Le tableau 2 présente les opioïdes selon leurs classes chimiques et leurs propriétés agonistes forts, agonistes mineurs ou modérés, agonistes-antagonistes mixtes ou antagonistes sur les récepteurs opioïdes.

Tableau 2: Classification chimique et pharmacologique de certains opioïdes utilisés en thérapeutique ou en toxicomanie.
(Somogyi 2007)

Structure de base	Agonistes forts	Agonistes mineurs à modérés	Agonistes Antagonistes mixtes	Antagonistes
PHÉNANTHÈNES	MORPHINE 	CODÉINE 	BUPRÉNORPHINE* 	NALOXONE 
	HÉROÏNE 	OXYCODONE 		NALTREXONE 
PHÉNYL-HEPTYLAMINES	MÉTHADONE 	DEXTROPROPOXYPHÈNE 		
PHÉNYL-PIPÉRIDINES	PÉTHIDINE 			

* La buprénorphine est un agoniste partiel des récepteurs Mu et antagoniste des récepteurs Kappa.

I.4- RECEPTEURS

Trois familles de récepteurs opioïdes ont été identifiées au niveau du système nerveux central (SNC) et d'autres tissus (vaisseaux, cœur, poumons, intestins, yeux, cellules inflammatoires/immunitaires circulantes, etc.). Leurs caractéristiques respectives sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractérisation des différents types de récepteurs opioïdes.

(Adapté de Katzung 2009, Lloret Linares 2009, Goodman 2011).

Sous type de récepteur	Fonction	Affinité des peptides opioïdes endogènes
Mu (μ) <i>Pré et postsynaptique</i>	Analgésie au niveau spinal et supra-spinal* Sédation Propriétés euphorisantes Propriétés dépressives respiratoires (<i>au niveau du noyau du tractus solitaire, du noyau ambigu et du noyau parabrachial</i>) Induction de la dépendance physique	β -endorphine > enképhalines > dynorphines
Delta (δ) <i>Essentiellement présynaptique</i>	Analgésie au niveau spinal** et supra-spinal	Enképhalines >> β -endorphine et dynorphines
Kappa (κ) <i>Essentiellement présynaptique</i>	Analgésie au niveau spinal** et supra-spinal Activité hallucinogène Myosis Sédation	Dynorphines >> β -endorphine et enképhalines

* Les récepteurs opioïdes μ modulent la réponse aux stimuli mécaniques, chimiques et thermiques, la nociception siégeant essentiellement au niveau supra-spinal.

** Les récepteurs δ et κ modulent la nociception thermique et chimique viscérale essentiellement au niveau spinal (moelle épinière pour les récepteurs δ et corne dorsale de la moelle épinière pour les récepteurs κ).

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la famille de récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, à 7 domaines transmembranaires, interagissant avec les protéines G hétérotrimériques

(G_i/G_o). Ces protéines présentant une activité GTPasique intrinsèque sont composées de 3 sous unités (α , β , γ) (Mague 2010, figure 3).

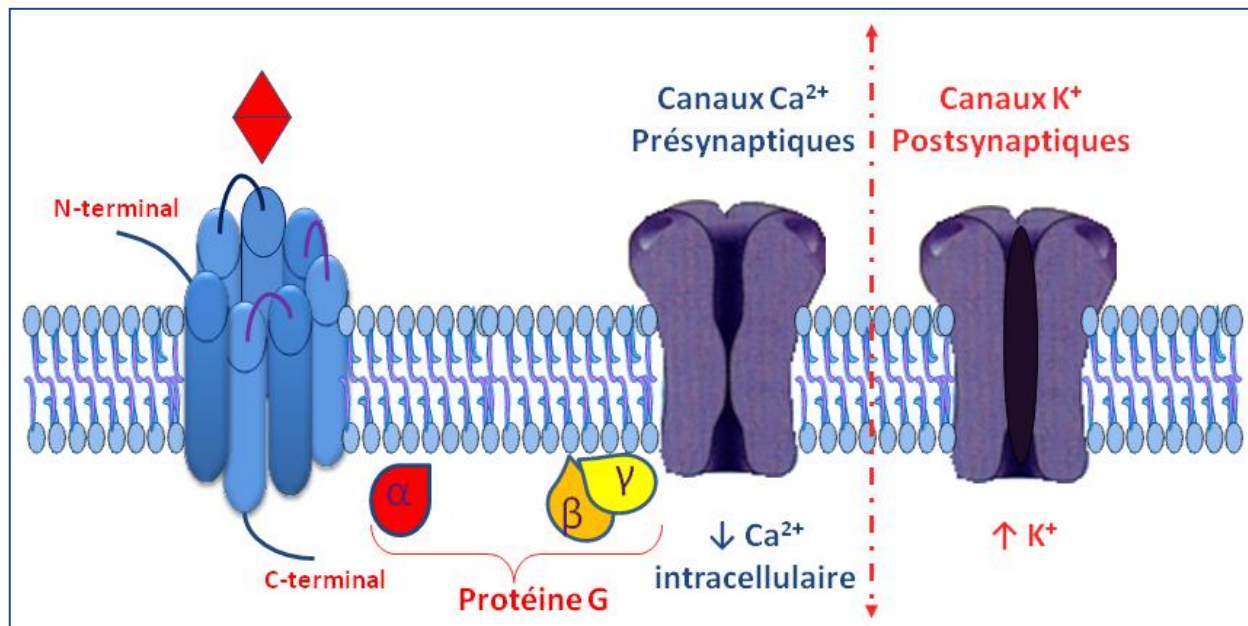


Figure 3: Représentation schématique du récepteur μ et de l'interaction avec la protéine G.

Le récepteur comprend sept domaines transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G.

L'activation de ces récepteurs induit une dissociation de la sous-unité α des sous-unités β - γ puis inhibition des canaux calciques voltage-dépendant (et donc réduction du taux de Ca^{2+} intracellulaire), stimulation de l'ouverture des canaux potassiques (K^+) et réduction du taux d'adénylate cyclase (figure 3). Tous ces mécanismes aboutissent à une réduction de la libération de neuromédiateurs excitateurs telles l'acétylcholine, la noradrénaline, la sérotonine et la substance P par les neurones pré-synaptiques, une réduction de la transmission synaptique et une hyperpolarisation de la membrane neuronale post-synaptique (PPSI) (Mague 2010, Katzung 2009, figure 4).

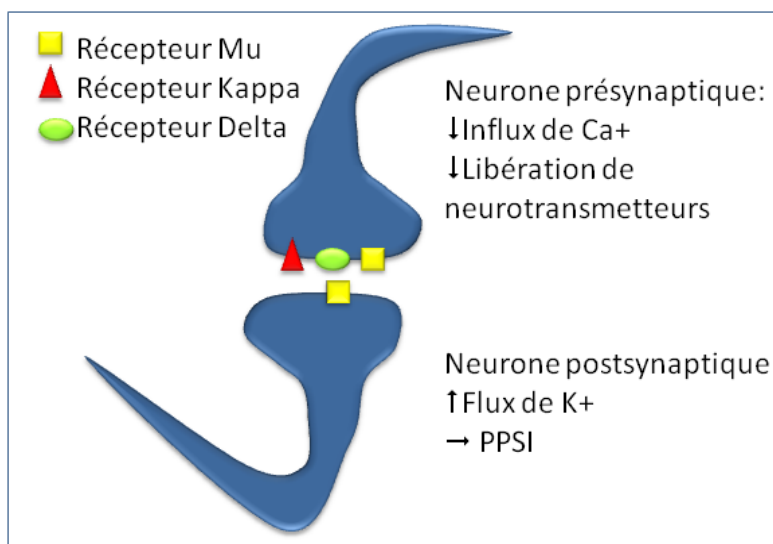


Figure 4: Représentation schématique de l'effet pré-synaptique des trois types de récepteurs et l'action post-synaptique du récepteur μ .

Les opioïdes induisent également une inhibition de la transmission GABAergique induisant une levée de l'inhibition du système dopaminergique, responsable de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (NAc), à l'origine de l'euphorie et du bien être ressenti suite à l'administration des agonistes opioïdes et la stimulation du circuit inhibiteur descendant (figure 5, adaptée de Le Marec 2010). L'activation des récepteurs μ est assurée par la fixation de ligands endogènes et exogènes. La β -endorphine se fixe avec une grande sélectivité et une forte affinité au récepteur μ et est considérée comme étant le ligand endogène de ce récepteur.

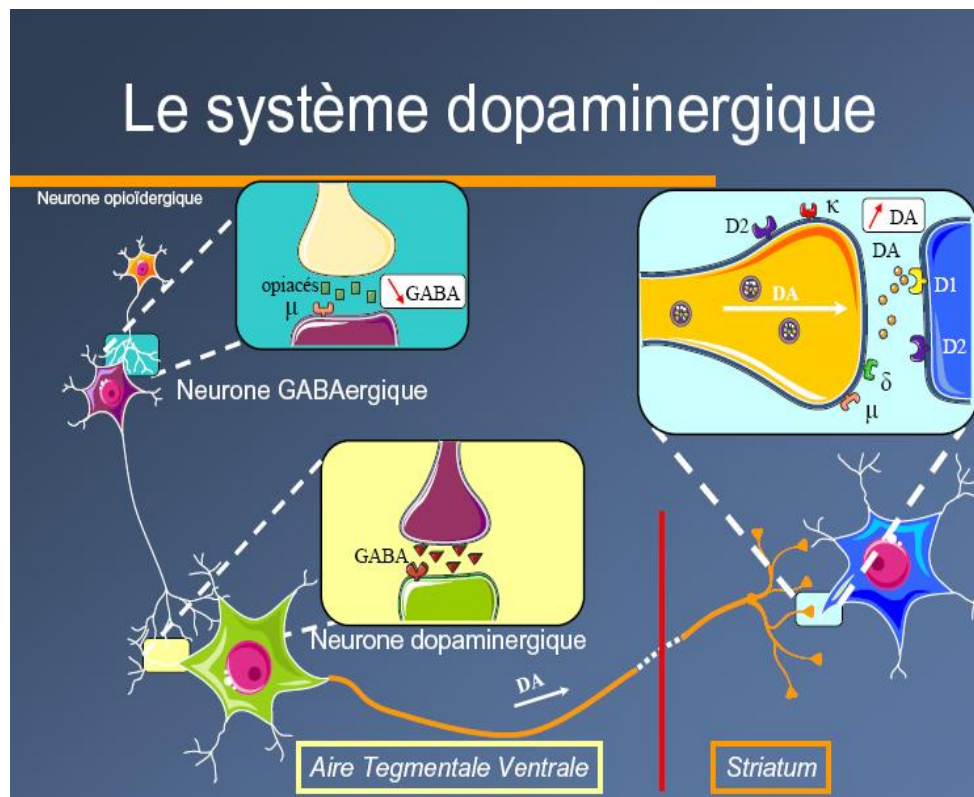


Figure 5 : Représentation schématique de l'activation du système dopaminergique suite à la stimulation des récepteurs opioïdes μ .

Le système de récompense est sous le contrôle des voies dopaminergiques qui partent de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et se projettent dans le NAc et le cortex frontal (Kalivas 1993). En se fixant sur les récepteurs opioïdes μ , les opioïdes provoquent une diminution de la quantité de GABA libérée. Le GABA diminue normalement la quantité de dopamine libérée au niveau du NAc. Les opioïdes augmentent donc la production de dopamine et la sensation de plaisir ressentie (Lichtermann 2000, Xi 2002, Nestler 2004, cf chapitre III, Dépendance aux opioïdes et son traitement).

De nombreux ligands opioïdes et non-opioïdes existent pour ce récepteur ; cependant, les plus décrits pour leur effet analgésique sont la morphine, la codéine et l'oxycodone (Zadina 1997, Raynor 1994, Mague 2010, Katzung 2009).

I.5- EFFETS DES AGONISTES OPIOÏDES

I.5.1- EFFETS SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Les principaux effets des analgésiques opioïdes ayant une affinité pour les récepteurs μ s'exercent sur le SNC :

- a. **Analgésie** : les propriétés analgésiques des opioïdes sont liées à leur capacité de changer à la fois la perception de la douleur et la réaction du malade à la douleur. Les analgésiques opioïdes peuvent élever de façon frappante le seuil de la douleur (*cf. chapitre II, La douleur et ses traitements*).
- b. **Euphorie** : après une administration de morphine, un malade éprouvant une douleur, ou un toxicomane, ressent une sensation plaisante de flottement et se sent libéré de son anxiété et de sa souffrance. Cependant, les autres malades et certains sujets normaux (qui ne souffrent pas) ressentent des effets dysphoriques après une administration d'analgésiques opioïdes, état d'inquiétude accompagné d'une agitation et d'une sensation de malaise. Le mécanisme par lequel les opioïdes induisent cette euphorie est complexe et partiellement élucidé. Une des hypothèses implique le rôle du système de récompense dopaminergique méso-corticolimbique (Goodman 2011).
- c. **Sédation** : une somnolence et un obscurcissement de l'état de conscience vont souvent de paire avec l'action d'un opioïde. Il y a peu ou pas d'amnésie. Ces effets sont fréquents chez les sujets âgés.
- d. **Dépression respiratoire** : la dépression respiratoire constitue la cause primaire de morbidité sous traitement par les opioïdes et une cause majeure de mortalité par intoxication (Pattison 2008). Tous les analgésiques opioïdes peuvent produire une dépression respiratoire en inhibant les centres respiratoires du tronc cérébral, par diminution notamment de la réponse à une exposition au gaz carbonique (CO₂) (Goodman 2011).
- e. **Action anti-tussive** : l'inhibition du réflexe de toux est un effet connu des opioïdes notamment la codéine par un effet direct sur le centre de la toux.

f. **Myosis** : on observe une contraction des pupilles avec pratiquement tous les agonistes opioïdes.

g. **Epilepsies et convulsions** : Certains cas de convulsions ont été décrits notamment chez des enfants (Young 2000) et chez des personnes traités par les morphiniques pour des douleurs en stade terminal (Vella-Brincat 2007).

h. **Nausées et vomissements** : les analgésiques opioïdes peuvent activer la zone gâchette chémoréceptrice au niveau de l'*area postrema* et ont peut être un effet sur l'appareil vestibulaire, provoquant ainsi des nausées et des vomissements (Goodman 2011).

I.5.2- PRINCIPAUX EFFETS PERIPHERIQUES

D'autres effets sont périphériques et s'exercent sur les systèmes suivants:

a. *Système cardiovasculaire* : les opioïdes sont capables d'induire une vasodilatation périphérique, une réduction de la résistance périphérique et une inhibition des reflexes des barorécepteurs. Ceci peut être à l'origine d'hypotension orthostatique observée essentiellement quand le patient passe de la position couchée à la position debout. De plus, la plupart des opioïdes entraînent une bradycardie modérée. Des cas **de torsades de pointe (Tdp) et d'allongement de l'intervalle QT** ont été observés sous **méthadone**.

b. *Tractus gastro-intestinal* : Il est estimé qu'environ 40 à 95% des patients traités par les opioïdes souffrent de **constipation** (Benyamin 2008). En effet, les agonistes opioïdes sont capables de réduire l'activité propulsatile des intestins et de réduire les sécrétions intestinales ce qui peut entraîner une augmentation de la viscosité des matières fécales par réduction de l'apport d'eau. A cela s'ajoute une réduction du stimulus de défécation et une augmentation du tonus du sphincter anal (Wood 2004). Les opioïdes contractent le muscle lisse des voies biliaires, ce qui peut provoquer une **colique hépatique et des spasmes biliaires**.

c. *Autres* : rétention urinaire, vasodilatation périphérique notamment au niveau de la peau du visage, du cou et du thorax (rougeur), prurit, immunodépression, hypothermie (Goodman 2011).

I.6- TOXICITE ET EFFETS INDESIRABLES

Les effets indésirables directs des analgésiques opioïdes incluent essentiellement la **dépression respiratoire qui constitue l'effet indésirable le plus grave**, nausées, vomissements et constipation. Ainsi la triade constitutive de l'intoxication aiguë par les agonistes morphiniques associe : **coma**, **dépression respiratoire** aiguë (secondaire à la dépression des centres respiratoires, Sporer 1999) et **myosis** (pouvant évoluer en mydriase). La flaccidité associée au coma peut être responsable d'une obstruction des voies aériennes supérieures par la langue qui précipite alors le décès. De plus, des phénomènes de **tolérance** et de **dépendance** (surtout physique) peuvent se développer notamment dans le cadre de l'utilisation chronique (*cf. chapitre III- Dépendance aux opioïdes et son traitement*).

II- DOULEUR ET SON TRAITEMENT

II.1- DEFINITION ET CIRCUITS DE LA DOULEUR

La douleur est un processus physiologique défini comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion (définition de l'Association internationale de l'étude de la douleur, Langlade 2001). Elle remplit une fonction d'alarme: avertir le sujet qu'un stimulus dit «nociceptif » menace son intégrité physique. Le terme nociceptif, introduit par Sherrington au début du siècle le définit comme un stimulus qui entraîne la mise en jeu de mécanismes de défense visant à sauvegarder cette intégrité (Burke 2007).

On distingue essentiellement :

- ▶ Les douleurs par **excès de nociception** qui correspondent à l'activation du système de transmission des messages nociceptifs par stimulation excessive des récepteurs périphériques mis en jeu par des processus lésionnels (destruction cellulaire), inflammatoires, ischémiques (entraînant des perturbations métaboliques locorégionales), ou par des stimulations mécaniques importantes (fractures, distensions viscérales ou étirements musculo-ligamentaires).
- ▶ Les **douleurs neurogènes** qui correspondent à une lésion du système nerveux, central ou périphérique (Langlade 2001).

Seules les douleurs par excès de nociception seront abordées dans le cadre de cette thèse.

Les mécanismes de la douleur et de sa transmission sont des phénomènes complexes résumés en trois étapes essentielles:

- L'élaboration de l'influx au niveau du nocicepteur et son acheminement par les nerfs sensitifs ;
- Le relais au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière ;
- L'intégration du message au niveau du cerveau puis la modulation du message douloureux.

II.1.1-NOCICEPTION ET ACHEMINEMENT DU MESSAGE DOULOUREUX

La douleur est ressentie suite à l'excitation de récepteurs appelés **nocicepteurs**. Ce sont des terminaisons nerveuses sensibles aux stimulations douloureuses. Ils siègent surtout dans la peau mais aussi dans les vaisseaux, les os, les tendons, les viscères et les organes internes. Les nocicepteurs répondent à différents types de stimuli : mécaniques, thermiques et chimiques. De très nombreux médiateurs sont libérés par les tissus lésés ou enflammés: par exemple bradykinine, histamine, sérotonine, prostaglandines, ATP.

Deux types d'information peuvent être véhiculés par les nocicepteurs, ayant comme conséquence deux types de douleurs.

Le premier type de douleur est **immédiat** et **localisé**. Il est véhiculé par des fibres sensibles myélinisées. Ces fibres transmettent les **douleurs aiguës** (*fast pain*) et de courte durée comme le pincement et la piqûre. Ce sont les fibres A δ (vitesse : 10-30 m/s) qui rejoignent le thalamus et le cortex sensitif.

Le second type de douleur est plus **diffus** et plus **tardif**. Il est véhiculé par des fibres amyéliniques. Ces fibres transmettent les douleurs chroniques diffuses (*slow wave pain*) comme la brûlure. Ce sont les fibres C (vitesse : 0.5- 2.5 m/s). Ces fibres vont ensuite rejoindre les structures cérébrales de l'intégration des émotions, de la mémorisation et de l'adaptation comportementale (Porth 2003).

II.1.2- RELAIS AU NIVEAU DE LA MOELLE EPINIERE, INTEGRATION ET MODULATION

La figure 6 représente les principaux circuits de la douleur depuis la périphérie jusqu'aux centres nerveux centraux, ainsi que la localisation des récepteurs opioïdes (représentés par des étoiles).

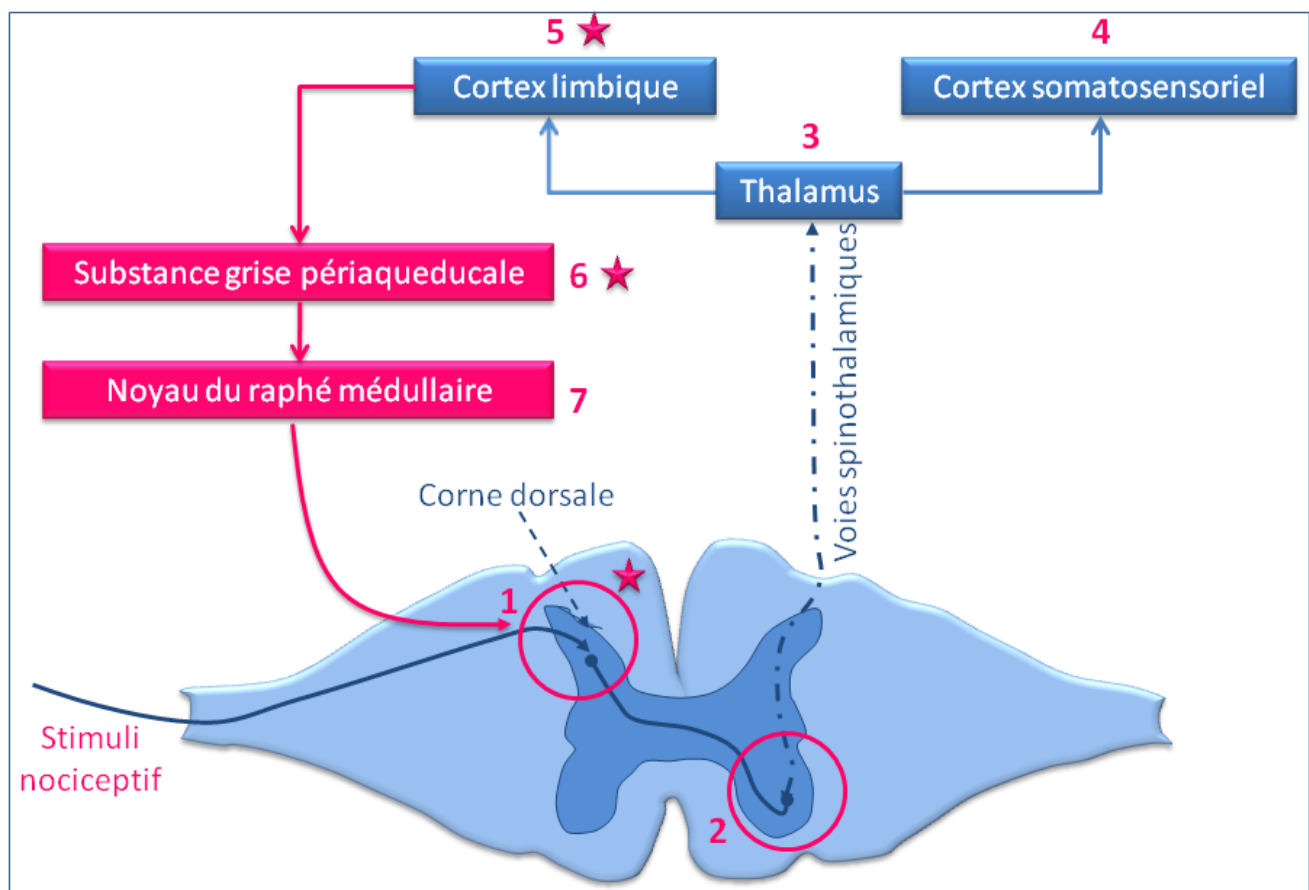


Figure 6: Représentation schématique des circuits de la douleur et des sites d'action des analgésiques opioïdes.

Suite à la stimulation des nocicepteurs, les influx nerveux véhiculant le message cheminent dans les nerfs afférents sensitifs primaires pour atteindre la corne dorsale de la moelle épinière (1). L'influx est conduit par le neurone de deuxième ordre dans la moelle épinière par les tractus spino-thalamiques ventraux (ou néospinothalamiques pour les douleurs aiguës) et latéraux (ou paléospinothalamiques pour les douleurs diffuses) (2) jusqu'au noyau ventral postéro-latéral du thalamus (3) où le message est perçu comme étant douloureux. Les influx sont ensuite relayés jusqu'à l'aire somesthésique du cortex permettant la localisation de la douleur et la détermination de son intensité, dans les aires S1 et S2 du côté opposé à la stimulation (4). Les influx sont également relayés au niveau du cortex limbique, zone du cerveau impliquée dans la composante motivo-affective de la douleur (vécu subjectif émotionnel) (5). La modulation de la douleur ascendante se fait par les voies descendantes (en rose) qui prennent naissance au niveau de la substance grise périaqueducale (6) puis arrivent au niveau du noyau du raphé médullaire (7) avant de se projeter de nouveau au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière. A ce niveau se fait la libération de neuromédiateurs inhibant le message douloureux et l'excitabilité au niveau de la corne postérieure. Les **étoiles** marquent les zones à forte densité en **récepteurs opioïdes**. Ces zones constituent ainsi les sites de contrôle endogène de la douleur (Goodman 2011, Porth 2003).

II.2- DOULEURS AIGUES ET CHRONIQUES

Les principales caractéristiques des douleurs aiguës et chroniques sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4: Principales caractéristiques des douleurs aiguës et chroniques.

(Adapté de Langlade 2001, Porth 2003)

CARACTERISTIQUES	DOULEURS AIGUES	DOULEURS CHRONIQUES
Début	Douleur récente	Douleur continue ou intermittente
Durée	Courte (<6 mois)	> 6 mois malgré le traitement antalgique
Réponse du système nerveux autonome (SNA)	Réponses proportionnelles à l'intensité des stimuli - ↑ Fréquence cardiaque, volume d'éjection et de la tension artérielle - ↑ Tension musculaire - ↑ Dilatation pupillaire - ↓ Motilité intestinale et de la sécrétion salivaire (sécheresse buccale)	Absence de réponse du SNA
Composante psychologique	- Anxiété associée - Peur	- ↑ Irritabilité - Dépression associée - Perte de motivation et de socialisation
Autres		- ↓ Sommeil - ↓ Libido - Modification de l'appétit

II.3- PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR : TRAITEMENT ANTALGIQUE

La prise en charge de la douleur est un élément primordial dans toute intervention thérapeutique à tel point que la douleur est actuellement considérée comme étant le cinquième signe vital, les quatre premiers signes vitaux étant la température, la fréquence cardiaque, la pression artérielle et la fréquence respiratoire. Une mauvaise gestion de la douleur pourrait avoir des conséquences physiologiques négatives importantes telle qu'une hyperréactivité du système nerveux autonome (augmentation de la tension artérielle, de la fréquence cardiaque, une suppression de la motilité gastro-intestinale, une diminution des sécrétions), une réduction de la mobilité induisant une atrophie musculaire importante, une raideur des articulations et tout cela contribue à la détérioration de l'état psychologique du patient (dépression, anxiété, trouble du sommeil, etc.).

L'analyse de la douleur comprend une évaluation :

- **de ses causes et ses mécanismes**

- douleur nociceptive par excès de nociception au niveau de la peau, des muscles ou des viscères
 - douleur neuropathique ressentie dans les traumatismes, ischémies et brûlures
 - douleur psychogène
 - douleur mixte ;
- **de sa topographie ;**
- **de son intensité**, par l'interrogatoire, l'examen clinique et éventuellement par un outil validé et/ou connu :
 - pour le patient capable de communiquer, l'auto-évaluation se fait à l'aide d'une échelle visuelle analogique (EVA); il s'agit d'une échelle d'évaluation de 0 à 10 où 0 correspond à l'absence de douleur et 10 à l'extrême opposé de l'intensité de la douleur (ex. maximum de douleur imaginable).
 - chez le malade incapable de communiquer, l'évaluation se fait par observation des postures, du faciès, des gémissements, de l'attitude antalgique, de la limitation des mouvements ou utilisation de l'échelle comportementale d'évaluation de la douleur chez la personne âgée (ECPA) ;
 - **de son retentissement** sur le comportement et l'état psychologique du patient et de son entourage (recherche d'une dépression et/ou anxiété qui nécessitent une prise en charge spécifique).

Suite à l'analyse sémiologique de la douleur et des résultats semi-quantitatifs de l'EVA, un traitement antalgique adéquat est instauré.

La douleur par excès de nociception est stratifiée en paliers, définis par l'organisation mondiale de la santé (OMS), auxquels correspondent des protocoles thérapeutiques (tableau 5).

L'utilisation des **opioïdes** doit être limitée au traitement de la **douleur modérée à très intense**. La morphine est classée en tant que stupéfiant.

Tableau 5: Classification de l'OMS : Paliers de la douleur et antalgiques.

PALIER I : Douleurs faibles à modérées (EVA<3) Stratégie : antalgiques périphériques non opioïdes Produits : Paracétamol, aspirine, anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)
PALIER II : Douleurs modérées à sévères (3<EVA≤6) Stratégie : antalgiques centraux opioïdes faibles +/- associés aux antalgiques du palier I ou aux corticoïdes en cure courte Produits : codéine, dextropropoxyphène, tramadol
PALIER III : Douleurs sévères à très sévères (6<EVA≤10) Stratégie : antalgiques centraux opioïdes forts Produits : Morphine et dérivés morphiniques tels le fentanyl, l'hydromorphone, l'oxycodone +/- associés aux coanalgésiques (tels les AINS, les antidépresseurs, les myorelaxants, etc.)

II.4- PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR PAR EXCES DE NOCICEPTION : PLACE DE LA MORPHINE

II.4.1- GENERALITES

Les opioïdes occupent une place importante dans le traitement antalgique et des études récentes ont montré une augmentation du taux de prescriptions de ces molécules à la fois pour la prise en charge de la douleur aiguë et chronique (Frasco 2005, Zaslansky 2011, Manchikanti 2010). Cependant, cette augmentation de prescription s'accompagne souvent d'une augmentation du risque d'apparition d'effets secondaires (Oderda 2007, Wu HL 2011).

La morphine se présente sous plusieurs formes pharmaceutiques selon l'indication thérapeutique :

- Voie parentérale : intraveineuse, sous-cutanée, péridurale, intrathécale et par pompe (surtout utilisée en postopératoire ou en soin palliatifs où le patient contrôle lui-même la quantité de morphine administrée) ;
- Voie orale : surtout sous forme de comprimés et de gélules (possibilité de formes à libération prolongée) pour le traitement des douleurs intenses essentiellement néoplasiques ;
- Autres : *patch* transdermique ou même suppositoire.

La relation dose-efficacité-tolérance est très variable d'un patient à l'autre. Il est important d'évaluer fréquemment l'efficacité (degré de soulagement de la douleur) et la tolérance (présence d'effet indésirable) et d'adapter la posologie progressivement en fonction des besoins du patient.

Généralement, pour le traitement des douleurs aiguës (notamment postopératoires), la morphine est le plus souvent administrée par voie intraveineuse, de manière fractionnée ("par titration"), à la dose de 1 à 3 mg (en fonction du terrain, principalement de l'âge du patient), toutes les 10 minutes (min) environ, jusqu'à obtention d'une analgésie satisfaisante (ou apparition d'effet indésirable) et avec surveillance continue du patient.

Si un traitement relais s'avère nécessaire, il peut se faire par analgésie contrôlée par le patient (PCA) par voie intraveineuse avec des bolus de 0,5 à 1 mg suivi d'une période sans injection possible ("période réfractaire") d'environ 10 min.

Si la douleur n'est toujours pas contrôlée, il convient d'augmenter la posologie quotidienne de morphine d'environ 30 à 50 %. Dans ce processus d'ajustement des doses, il n'y a pas de dose maximale tant que les effets indésirables peuvent être contrôlés (<http://www.theriaque.org>).

II.4.2- PHARMACOCINETIQUE DE LA MORPHINE

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques de la morphine sont résumées dans le tableau 6 :

Tableau 6: Paramètres pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme.
(Goodman 2011, Christrup 1997)

Absorption	<ul style="list-style-type: none"> - Biodisponibilité morphine <i>per os</i> : ~25 % → effet important de premier passage hépatique - Substrat de la P-glycoprotéine
Distribution	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison aux protéines plasmatiques : ~ 30% - Passage faible au niveau du SNC en raison de sa faible liposolubilité
Métabolisme	<p>Hépatique (figure 7) : UDP-glucuronyltransférase (UGT 2B7)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Voie majeure : conjugaison avec l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison) → formation de la morphine-6-glucuronide (M6G) et de la morphine-3-glucuronide (M3G) : bien que polaires, ces molécules sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour exercer un effet au niveau central.

	- Voie mineure : N-déméthylation de la morphine en normorphine.
Elimination	<ul style="list-style-type: none"> - $T_{1/2}$: ~ 2h (le $T_{1/2}$ de la M6G est encore plus long) - Voie urinaire : élimination par filtration glomérulaire essentiellement sous forme de M3G, très peu d'élimination sous forme inchangée - 90% de la dose administrée est éliminée dans les 24 premières heures - Cycle entérohépatique faible pour la morphine et ses métabolites : capacité de les retrouver dans les selles plusieurs jours après la dernière prise.

II.4.3- PHARMACODYNAMIE DE LA MORPHINE ET SES METABOLITES

La morphine exerce son activité analgésique en mimant les effets des endorphines sur les trois sous-types de récepteurs aux opiacés (avec une sélectivité largement en faveur des récepteurs μ , environ 1000 fois plus importante qu'au niveau des récepteurs κ et δ) et élève ainsi le seuil de perception de la douleur. L'action antinociceptive se caractérise expérimentalement par une augmentation des seuils nociceptifs quel que soit le test utilisé : thermique, chimique, électrique ou à la pression. La morphine est un antalgique dit « central » possédant une action supra-spinale et spinale.

L'action supra-spinale participe à la modification de la perception de la sensation douloureuse et au renforcement des contrôles inhibiteurs descendants. Au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière, la morphine a une action pré et postsynaptique du fait de son effet agoniste préférentiel pour les récepteurs μ qui sont nombreux dans cette structure. Ce site d'action inhibe directement la transmission des messages nociceptifs entrants. Le produit de glucuronoconjugaison hépatique de la morphine, la M6G a des propriétés pharmacologiques distinctes de celles de la morphine. Cette molécule est environ deux fois plus analgésique que la morphine dans des modèles animaux (Paul 1989) et chez l'homme (Osborne 1988).

Lors d'une administration chronique, la M6G est responsable de la majeure partie de l'analgésie produite par la morphine (Osborne 1988, Lötsch 2005.a). La M3G, par contre, présente une faible affinité pour le récepteur opioïde et semble plutôt médier les effets euphorisants de la morphine (Smith 2000).

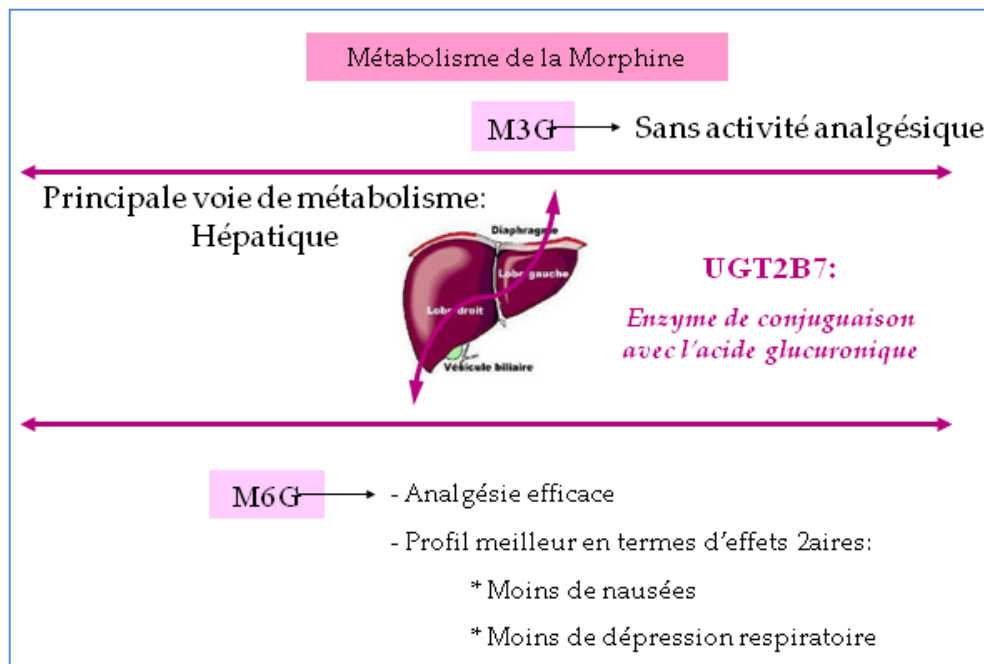


Figure 7: Représentation schématique du métabolisme de la morphine et de l'activité des métabolites.

(Hasselstrom 1990, Christrup 1997, Penson 2000, Grace 1996)

II.4.4- EFFETS INDESIRABLES

Les effets indésirables de la morphine découlent directement de son action sur les différents organes, en particulier le SNC. Ces effets incluent les **nausées, vomissements, sédation, vertiges, confusion, dysphorie, prurit, constipation, augmentation de la pression au niveau du tractus biliaire, rétention urinaire, hypotension** et plus grave encore la **dépression respiratoire**. De nombreux facteurs altèrent la sensibilité des patients vis-à-vis des effets de la morphine, en particulier l'intégrité de la BHE. Ainsi, les nouveau-nés (présentant une immaturité de la BHE) et les adultes ayant une atteinte de cette intégrité, présentent un risque accru de dépression respiratoire du fait d'un passage plus important de la morphine au niveau central. De plus, les patients traités pour des douleurs sévères tolèrent des doses de morphine plus importantes. Cependant, quand le stimulus douloureux diminue, le patient pourra présenter plus de sédation et de dépression respiratoire suite à la réduction de l'effet douloureux stimulant central.

II.4.5- USAGE THERAPEUTIQUE

a- Douleur aigue

La prise en charge de la douleur aigue postopératoire est un enjeu majeur. Seulement 25% des patients douloureux en postopératoire reçoivent un traitement approprié (Wu HL 2011). L'introduction de nouvelles normes, protocoles et recommandations n'a pas réduit significativement

la douleur ressentie en postopératoire (Sommer 2008, Apfelbaum 2003). Afin d'améliorer la prise en charge des patients, les recherches se focalisent sur l'identification de facteurs prédictifs de la douleur postopératoire. Ainsi, la douleur pré-opératoire, l'anxiété, le jeune âge, l'obésité, la peur de l'opération, le type de chirurgie (abdominale, orthopédique, thoracique, de longue durée) ont été identifiés comme facteurs prédictifs de la douleur. Le type de chirurgie, l'âge du patient et le stress psychologique ainsi que la clearance rénale et la consommation de psychotropes permettent également de prédire la consommation d'antalgiques en postopératoire (Coulbault 2006, Wu HL 2011, Wu CL 2011). Des facteurs génétiques semblent également influencer à la fois la sensibilité à la douleur et les doses d'analgésiques requis pour une analgésie efficace (*cf. Chapitre IV - Facteurs de variabilités de la réponse aux opioïdes*). Il est donc nécessaire d'intégrer ces facteurs lors de la prise en charge de la douleur aigue.

b- Douleur chronique

La douleur chronique, observée dans les cancers et autres maladies en phase terminale, est le plus souvent due à la pathologie sous-jacente mais également aux traitements administrés pour traiter ces pathologies. Ainsi, avec l'évolution de la maladie, la douleur devient de plus en plus sévère.

En 1986, l'OMS classa les opioïdes comme étant le traitement de référence (*gold standard*) des douleurs modérées à sévères (OMS 1990, revue Colson 2011). En 2008, l'*American Society of Interventional Pain Physicians* publia des recommandations pour la prise en charge de la douleur chronique non cancéreuse (Trescot 2008). Les auteurs concluaient qu'il existait peu d'arguments en faveur de l'utilisation de la morphine pour la réduction de la douleur ou l'amélioration des fonctions des patients (Trescot 2008, Manchikanti 2010). Cependant, la morphine occupe une place importante dans la prise en charge des douleurs chroniques cancéreuses comme l'attestent les revues des nombreuses études cliniques randomisées réalisées dans ce domaine (Colson 2011).

Avec l'utilisation répétée de morphine ou de ses substituts, apparaît une perte progressive de l'efficacité ou **tolérance**. La tolérance ne devient cliniquement manifeste qu'après deux à trois semaines d'administration fréquente, aux posologies thérapeutiques habituelles. Elle se développe rapidement quand des doses importantes sont administrées à des intervalles brefs et elle est moindre lorsqu'il s'agit de petites quantités de médicaments avec des intervalles d'administration plus importants. Selon le produit et l'effet mesuré, le degré de tolérance peut être tel que les doses doivent

être multipliées par 35. La tolérance pour les effets euphorisants et respiratoires des opioïdes disparaît en quelques jours après que le médicament ait été arrêté. Par contre, la tolérance pour les effets émétisants peut persister pendant plusieurs mois après l'arrêt du médicament.

Les patients recevant la morphine à visée analgésiante ne ressentent pas de syndrome de sevrage à l'arrêt progressif du traitement. Mais ces patients peuvent ressentir des symptômes de manque si le traitement est stoppé par l'injection d'un antagoniste opiacé (sevrage induit : dépendance physique sub-clinique).

Enfin, **l'hyperalgésie** rapportée à la fois dans les traitements aigus et chroniques à la morphine est ressentie par le patient comme étant une sensibilité exagérée à une stimulation nociceptive. Elle témoigne d'un abaissement du seuil aux stimulations nociceptives et/ou d'un accroissement de réponse aux stimulations supraliminaires (Langlade 2001).

III- DEPENDANCE AUX OPIOÏDES ET SON TRAITEMENT

III.1- HISTOIRE DE LA MALADIE

De tout temps, les hommes ont cherché dans la consommation de substances psychotropes, un moyen de s'exprimer, de se dépasser, de se mettre en « prise » directe avec le divin mais aussi un plaisir, accessible immédiatement, un remède pour exorciser la misère ou tout simplement pour calmer la faim. La plupart des substances psychoactives ont une existence millénaire et ont été utilisées dans le cadre de manifestations communautaires, pour des raisons médicales et rituelles. Chez les Grecs, par exemple, le pavot appartenait à la déesse Nux (la nuit) et à Morphée qui, selon la mythologie, dispensait aux mortels le sommeil en les touchant d'une fleur de pavot. C'est le bouleversement de ces rituels, l'affaiblissement des structures communautaires, l'introduction des substances « étrangères » dont la diffusion est facilitée par le développement des échanges, qui sont responsables des « ravages » de la drogue dans une collectivité donnée. C'est ainsi que l'opium a envahi massivement l'empire chinois au XIX^{ème} siècle après une guerre sans pitié économique et militaire. Et c'est après la transformation chimique industrielle à des fins pharmaceutiques par des chercheurs allemands chez Bayer de l'opium en morphine puis en héroïne, que des cas d'intoxication commencent à être rapportés à partir du XIX^{ème} siècle.

III.2- ADDICTIONS AUX OPIACES

Le nombre total de consommateurs d'opiacés au niveau mondial est estimé actuellement entre 15,2 et 21,1 millions de personnes, soit 0,4% de la population mondiale de 15 à 64 ans (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2009). Dans l'union européenne, le rapport annuel de l'observatoire européen des drogues et des toxicomanies (OEDT) 2009 estime près de 1,4 millions (1,2 à 1,5 millions) de consommateurs d'opiacés en 2007. Ainsi, les opiacés, essentiellement **l'héroïne** représentent la troisième forme la plus commune des drogues illicites.

L'héroïne vendue en Europe est fabriquée à partir d'opium produit dans différents pays asiatiques. La majorité de l'héroïne, de couleur brune, est originaire de l'Inde, du Pakistan et surtout d'Afghanistan. On estime que l'opium afghan est à l'origine de 70 à 80% de l'héroïne qui circule sur le marché européen. A côté de l'héroïne brune, on trouve également de l'héroïne blanche originaire des pays du

Triangle d'or, relativement rare en Europe, contrairement à l'Amérique du Nord, où elle domine le marché.

La consommation d'héroïne, en particulier par voie intraveineuse, représente toujours la part la plus importante de la morbidité et de la mortalité liée à la consommation de drogues dans l'Union européenne (OEDT).

Le niveau d'expérimentation (usage au moins une fois dans la vie) de l'héroïne en population générale en France est faible. Il ne dépasse pas les 1 % (alors qu'il est de 1,5% aux Etats-Unis) que ce soit chez les 15-34 ans (0,9 %) ou les 35-64 ans (0,7 %). Le nombre d'expérimentateurs d'héroïne en France parmi les 12-75 ans est estimé à 360 000 personnes. Il existe trois grands modes d'administration de l'héroïne: l'injection intraveineuse (IV), l'administration per nasale («*sniff*») et l'inhalation. Les deux premiers sont les plus répandus tandis que le troisième semble nettement plus minoritaire (Observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT) -Tendance 2010). L'injection d'opioïdes par voie intraveineuse donne lieu à un *flash* qui est une réaction brutale et intense d'euphorie. Le sujet ressent alors un état de bien être et de tranquillité, apaisant toute angoisse. Cet état est suivi d'un effet sédatif et d'induction d'un sommeil profond (Katzung 2009).

Parmi les opioïdes, les molécules qui sont les plus sujettes à une utilisation abusive sont donc l'héroïne (360 000 usagers en France en 2006 -OFDT-, près de 1,5 million en Europe en 2010 - OEDT- près de 8 millions dans le monde, <http://www.cia.gov>). Bien que la prévalence générale de l'utilisation d'opioïdes soit demeurée relativement stable au cours des dernières années (*United Nations Office on Drugs and Crime* 2009) l'usage d'opioïdes sans prescription médicale, telles que l'hydrocodone et l'oxycodone, est en hausse (Johnston 2009) principalement chez les adolescents. Au Liban, il n'existe pas de données épidémiologiques concernant l'usage abusif de substances.

La **pharmacodépendance**, résultant de l'interaction entre un organisme vivant et une substance, se caractérise par des modifications du comportement et par une compulsion à prendre le produit afin de retrouver ses effets psychiques et d'éviter le malaise de la privation (syndrome de sevrage). La **dépendance** est le plus souvent évaluée à l'aide d'un questionnaire, le DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*, 4^{ème} édition). Elle comprend au moins trois des signes suivants: une **tolérance** (augmentation des doses pour un effet similaire ou effet nettement diminué si les doses sont maintenues), un **syndrome de sevrage** en cas d'arrêt, une incapacité à gérer sa propre

consommation, un temps de plus en plus important consacré à la **recherche du produit**, un abandon des activités sociales, culturelles ou de loisir et la **poursuite de la consommation** malgré la conscience des problèmes qu'elle engendre.

Chez l'homme, les signes cliniques associés au **sevrage** à l'héroïne débutent dans les 4 à 6 heures (h) qui suivent la dernière prise, atteignent leur maximum vers 12 à 48 h et cessent habituellement en environ 5 jours. Au contraire, en cas d'arrêt de la méthadone, ces signes apparaissent en 24 à 36 h et s'accroissent vers le 5^{ème} au 7^{ème} jour. Ce syndrome se compose de plusieurs symptômes : « *craving* » (envie impérieuse de consommer et de ressentir les effets du produit), des douleurs, crampes et sursauts musculaires, frissons, diarrhées, nausées et vomissements, insomnie, agressivité, rhinorrhée, hypersudation, hyperpnée, hyperthermie et hypertension artérielle ainsi que des troubles de l'humeur, une insomnie et des signes d'anxiété. En cas de sevrage prolongé, le patient pourra présenter une persistance de l'angoisse ainsi qu'une hypotension, bradycardie, hypothermie, mydriase et une réduction de la réactivité des centres respiratoires centraux au dioxyde de carbone (Katzung 2009). L'intensité des symptômes de sevrage explique le fort taux de rechute après tentative d'arrêt de la consommation d'opiacés.

Les opiacés utilisés en dehors de toute indication thérapeutique induisent très rapidement une dépendance physique, l'intensité des symptômes de sevrage croissant avec la répétition des prises. L'usage des psychotropes renforce le comportement de consommation (renforcement positif ou négatif). La **dépendance physique** est un état adaptatif en réponse à l'administration répétée de la substance qui induit une altération des différents systèmes de neurotransmission auparavant à l'équilibre. Ces systèmes s'adaptent progressivement à la présence de la substance en recherchant de nouveaux équilibres. Dès l'arrêt des prises, les systèmes de neurotransmission tendent à retourner progressivement aux équilibres initiaux.

III.3- COMPLICATIONS

Le risque fatal par *overdose* reste la complication la plus grave et la plus observée à cause de l'effet dépressur respiratoire des opiacés.

Le nombre de surdosages mortels liés aux opiacés était stable en 2009 avec 40 décès contre 42 en 2008. Ces chiffres sont sous-estimés car certains décès ne sont vraisemblablement pas portés à la connaissance des services répressifs (Usage et trafic des produits stupéfiants en France en 2009).

Parmi les 217 décès recensés par le dispositif DRAMES en 2008, l'héroïne est présente dans 36,4 % des cas, seule ou en association avec d'autres produits (à savoir que l'enquête DRAMES ou enquête sur Décès en Relation avec l'Abus de Médicaments et de Substances fait partie des enquêtes conduites par l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) afin d'identifier des décès liés à la drogue en France). Les données de l'Inserm (CépiDc, Centre d'épidémiologie sur les Causes Médicales de Décès de l'INSERM) font état pour 2007 de 32 décès liés aux opiacés (soit 11 %) et de 152 décès dus à la poly-consommation de drogues (soit 53 %).

L'intoxication chronique aux opiacés est à l'origine de nombreuses **complications psychiatriques** (Astals 2009), **sociales**, **judiciaires** mais également **septiques** : infections par le virus de l'immunodéficience acquise (VIH) et de l'hépatite C (VHC), infections bactériennes à l'origine de méningites, ostéomyélites et d'abcès.

L'usage de drogues mal purifiées contenant de fortes quantités de la neurotoxine N-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) a conduit à des syndromes parkinsoniens chez les usagers.

III.4- MECANISMES MOLECULAIRES ET NEUROBIOLOGIQUES DE LA TOLERANCE ET DE LA DEPENDANCE : IMPLICATION DU SYSTEME DE RECOMPENSE

Les mécanismes moléculaires de la tolérance et de la dépendance physique sont encore à l'étude. Au cours d'une administration chronique, l'activation persistante des récepteurs joue un rôle important dans l'induction et le maintien de ces manifestations, notamment via le récepteur opioïde δ . Les hypothèses actuelles ont abandonné la notion simple de rétrocontrôle positif du système de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (*up regulation*) ou celle de l'internalisation des récepteurs ou de réduction de leur synthèse (*down regulation*). Actuellement, le concept de **découplage de récepteur** est le plus admis. L'usage chronique des opioïdes induit une réponse cellulaire d'adaptation, associée à une **inhibition de l'adénylate cyclase**, un dysfonctionnement des interactions structurales entre les récepteurs et la protéine G d'une part, les systèmes de seconds messagers et canaux ioniques d'autre part. Certaines études ont également suggéré le rôle du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans le développement et le maintien de la tolérance, puisque l'usage d'antagonistes de ce récepteur est capable de bloquer le développement de la tolérance (Nestler 2001, 2004, Dykstra 2011, Fischer 2010, Ueda 2009).

D'un point de vue neurobiologique, le comportement addictif observé avec les opioïdes fait intervenir essentiellement deux systèmes de neurotransmission : le système dopaminergique et le système opioïdergique (Nestler 2004, figure 8).

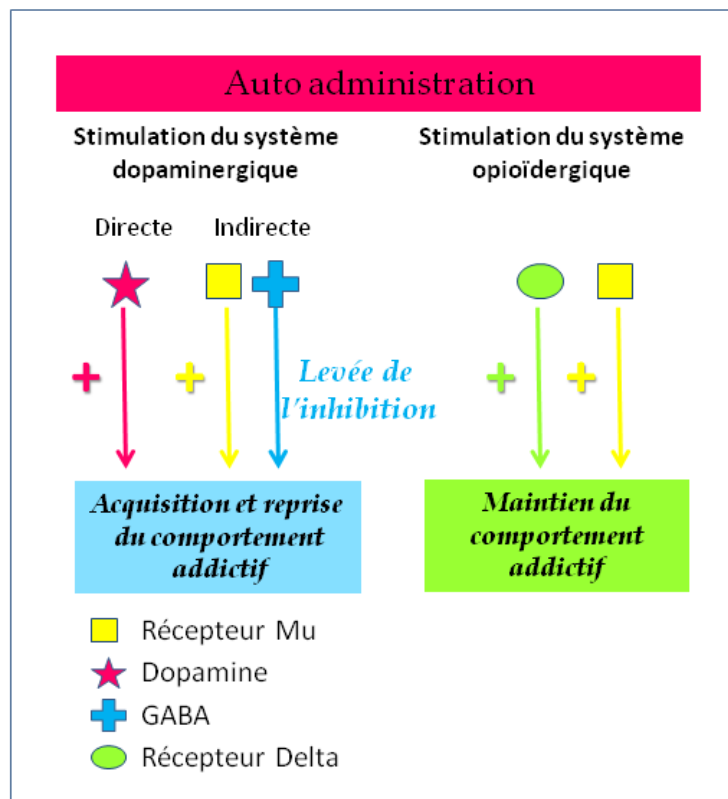


Figure 8: Mécanisme neurobiologique du comportement addictif.

L'acquisition et la reprise du comportement addictif dépendent chez le rongeur du système dopaminergique (stimulation directe de la transmission dopaminergique mésolimbique, ou indirecte par levée de l'inhibition GABAergique, ou indirecte via l'activation des récepteurs μ) alors que la maintenance de ce comportement relève du système opioïde (stimulation du système de recherche impliquant les récepteurs μ et δ). Ainsi, la dépendance aux opiacés, agissant tant sur les voies dopaminergiques qu'opioïdergiques, est une dépendance avec maintenance du comportement, et l'abstinence conduit fréquemment à des rechutes et la consommation apparaît essentiellement en continu.

Les structures cérébrales impliquées dans les circuits de récompense constituent le système mésocortical limbique (*cf. figure 4*). De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont associé le dysfonctionnement du circuit de récompense (ou de renforcement) à la mise en place du comportement addictif. Ce comportement repose sur une composante **affective** (plaisir provoqué par les «récompenses», ou au déplaisir provoqué par les «punitions»), une composante **motivationale** (motivation à obtenir la «récompense» ou à éviter la «punition») et motivation **cognitive** (apprentissages généralement réalisés par conditionnement).

Au cours du sevrage induit des opiacés, une hyperactivité noradrénergique est observée chez l'animal, ainsi qu'une forte libération de glutamate et d'aspartate dans le *locus coeruleus* et une forte réduction de la libération dopaminergique dans le NAc (Aghajanian 1994).

III.5- TRAITEMENTS DE SUBSTITUTION : LA METHADONE

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif de la dépendance à l'héroïne, en dehors du sevrage. La seule alternative médicamenteuse proposée est la substitution.

Le traitement de substitution tente de pallier les effets de la dépendance aux opiacés dans le cadre d'une prise en charge médicale, sociale et psychologique: l'apport sur une longue durée d'opiacés licites à demi-vie longue permet aux patients de sortir de la recherche répétitive et pluriquotidienne d'héroïne, de sortir de l'illégalité (diminution voire l'arrêt des drogues illicites, diminution de la criminalité) et d'accéder au système de soins pour le traitement des complications somatiques (arrêt des injections, diminution de la mortalité par overdose, diminution de l'incidence de l'infection par le VIH et le VHC, amélioration du pronostic des sujets infectés, amélioration du pronostic des grossesses) et psychiatriques causées par l'intoxication chronique à l'héroïne (Shi 2007).

Le but est dans un premier temps de stabiliser les patients par ce traitement, et dans un second temps de réduire progressivement les doses jusqu'à l'arrêt définitif (Katzung 2009).

L'objectif ultime est de favoriser l'insertion sociale des usagers et de permettre à chaque patient d'élaborer une vie sans pharmacodépendance, y compris à l'égard des médicaments de substitution des opiacés (source OFDT).

III.5.1- DEVELOPPEMENT DES TRAITEMENTS DE SUBSTITUTION

En 1963, devant les échecs relatifs des prises en charge psychothérapique des toxicomanes, le pharmacologue V Dole et la psychiatre M Nyswander, expérimentent les effets de la méthadone, dans le cadre d'une étude financée par le *New York Health Research Council* à l'hôpital pénitentiaire de Lexington (1965-1968). Ils constatent qu'administré par voie orale, ce produit ne provoque pas d'euphorie et permet l'abandon de la quête tyrannique du produit illicite et la diminution des incidences sociales de celle-ci.

En 1972, la FDA autorise l'utilisation de la méthadone dans le traitement de la dépendance aux opiacés. L'existence des toxicomanies graves aux opiacés a conduit dès 1973, à prescrire des chimiothérapies de substitution (méthadone) dans le cadre de maintenances thérapeutiques. Cette pratique est restée confidentielle pendant de nombreuses années et il a fallu près de 15 ans pour que cette technique soit reconnue. En 1984, la buprénorphine obtenait une autorisation de mise sur le marché (AMM) suscitant un grand intérêt (agoniste partiel, son effet plafond limite les risques de

surdose), mais également des réserves après le choix d'une commercialisation sous forme injectable et son détournement par certains toxicomanes, ce qui a donné lieu en France à une interdiction, puis, en 1995, à une autorisation de prescription sous conditions strictes. A partir de cette date, les prescriptions se sont multipliées et elle constitue actuellement la molécule majoritairement prescrite dans le cadre de la substitution avec plus de 80 000 patients sous Subutex® contre près de 30 000 patients sous Méthadone en 2007 en France (OFDT). Depuis la mise à disposition des produits de substitution de l'héroïne, l'épidémiologie des intoxications aiguës aux opiacés s'est considérablement modifiée. Les conduites toxicomaniaques ont évolué, avec une tendance à l'association de produits opioïdes et/ou de psychotropes. Les mésusages sont désormais nombreux : injection intraveineuse de comprimés pilés, trafic et revente de rue, multi-prescription, abus, association des benzodiazépines à la consommation de cocaïne, de crack, ou d'alcool, avec le risque d'intoxications graves voire fatales.

Des essais de prescription d'antagonistes opiacés ont également été réalisés. La naloxone, est essentiellement utilisée pour le traitement des intoxications ou surdosages opioïdes alors que la naltrexone, un autre antagoniste, a plutôt été préconisée dans le sevrage alcoolique. L'usage de la clonidine, un antihypertenseur d'action centrale, a également été envisagé afin de réduire les variations importantes de l'activité du système nerveux sympathique qui stimule la libération d'opioïdes endogènes.

A noter que la prise en charge de la toxicomanie au Liban reste une prise en charge psychologique et spirituelle, les traitements de substitution n'étant pas encore disponibles. Il existe une loi pour l'importation de la méthadone et la buprénorphine mais cette loi n'est toujours pas rentrée en vigueur.

Au final, à l'heure actuelle, il n'y a pas de théorie uniciste de la dépendance, et aucun modèle (neurobiologique, comportementaliste, psychanalytique) ne rend compte à lui seul de la clinique de la dépendance. De plus, les toxicomanes ne forment pas une population homogène. La méthadone n'est réellement efficace que dans le contexte d'une approche multidisciplinaire et personnalisée des soins aux personnes dépendantes des opiacés. Ainsi, **l'individualisation du traitement de substitution par la méthadone passe d'abord par la connaissance parfaite de la pharmacocinétique, pharmacodynamie et effets secondaires de cette molécule puis par l'identification des facteurs de variabilité de la réponse au traitement.**

III.5.2- LA METHADONE

a- Généralités

La méthadone constitue actuellement la molécule la plus efficace et la plus prescrite aux Etats-Unis et dans le monde dans le traitement de la dépendance aux opiacés (Kreek 2010). En France, elle est utilisée depuis 1995 dans le cadre d'une AMM qui réserve l'initiation des traitements à des centres spécialisés avec possibilité de relais ultérieur en médecine de ville.

La méthadone est un opiacé de synthèse, la **6-diméthylamino-4-4-diphenyl-3-heptanone**, utilisé à la fois comme traitement antalgique et dans le traitement de substitution de la dépendance aux opiacés, de part ses propriétés pharmacodynamiques (agoniste opiacé) et pharmacocinétiques. Une **bonne biodisponibilité par voie orale** (supérieure à 90%) ainsi qu'une **longue demi-vie** (avec un stockage hépatique, 80% du produit absorbé sont retenus lors du premier passage hépatique) sont deux propriétés pharmacocinétiques de la méthadone particulièrement recherchées dans le cadre d'un traitement de substitution puisqu'elles permettent l'abandon de la voie intraveineuse et une administration quotidienne unique (Wolff 1993, Vazquez 2006, Weber 2000). Le traitement à base de méthadone est composé en France d'un **mélange racémique de deux énantiomères** (R- et S-) et se présente sous forme de sirop buvable contenant de 5, 10, 20, 40 ou 60 mg de principe actif ou de gélules contenant 1, 5, 10, 20 ou 40 mg de principe actif. Chez le patient dépendant des opiacés, elle supprime les symptômes de manque et à doses ajustées n'induit pas d'effets stupéfiants, ni d'altération de la vigilance ou des performances cognitives.

La dose initiale de méthadone est généralement de **20 à 40 mg/jour** ; la dose est ensuite augmentée graduellement, par paliers de 10 mg tous les 4 à 7 jours, puisqu'une augmentation de dose plus importante que le taux de développement de tolérance pourrait induire une accumulation et par la suite une sédation et une dépression respiratoire (Borg 1995, Kreek 2010).

b- Pharmacodynamie de la méthadone

Les effets de la méthadone sont principalement **médiés par les récepteurs μ** et sont ceux d'**agonistes purs** (Weber 2000). Elle est également, à moindre degré un agoniste des récepteur κ (Kristensen 1995). Les effets subjectifs de plaisir et d'euphorie des opiacés sont essentiellement médiés par les

récepteurs μ (et δ à un moindre degré), dont l'activation est également responsable d'analgésie, dépression respiratoire, myosis et constipation. La dépendance physique dont témoigne le syndrome de sevrage ou manque est associée aux agonistes μ . Cependant, *in vitro*, la méthadone semble avoir des actions différentes que la morphine sur ces récepteurs μ , qu'elle "désensibilise" (internalisation des récepteurs, réduction de leur synthèse, etc.) en supprimant la capacité des opiacés, administrés secondairement, d'inhiber l'adénylate-cyclase. La méthadone possède également des propriétés antagonistes au niveau des récepteurs NMDA qui semblent être liées au développement de la tolérance (Davis 1999).

Dans le mélange racémique des deux énantiomères (R- et S-), c'est la forme R-méthadone qui est active (avec une affinité environ 50 fois supérieure à celle de la forme S-méthadone) (Eap 2002, Crettol 2006). Le rôle de l'énantiomère S- est encore mal défini mais il semble être impliqué dans les effets secondaires de la méthadone (fatigue, confusion, tension, etc.) (Elkader 2009, Mitchell 2004).

c- Pharmacocinétique de la méthadone

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques de la méthadone sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 7: Paramètres pharmacocinétiques de la méthadone chez l'homme.

(Eap 1996, Boulton 2001, Eap 2002, Ferrari 2004).

Absorption	<ul style="list-style-type: none"> -Tmax : 2-4 h -Biodisponibilité : 40-90% -Substrat de la P-glycoprotéine (P-gp)
Distribution	<ul style="list-style-type: none"> -Volume de distribution : 300-500 L -Liaison aux protéines plasmatiques : 90% (essentiellement orosomucoïde) stéréosélectivité -Fraction liée variable d'un sujet à l'autre -Concentrations sériques cibles : 400 $\mu\text{g/L}$ pour (R,S)-méthadone et 250 $\mu\text{g/L}$ pour R-méthadone -A l'équilibre : variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques des racémiques
Métabolisme	Hépatique (stéréosélectivité):

	<ul style="list-style-type: none"> - Cytochrome 3A4 : +++ (70%) - CYP 2B6, 2D6, 2C9, 2C19, 3A5: + - N-Déméthylation et cyclisation: métabolites inactifs→ *2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP, métabolite primaire de la méthadone) *2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EMDP, métabolite secondaire)
Elimination	<ul style="list-style-type: none"> -T_{1/2} : 22-60h -Voie hépatobiliaire (20-40% -métabolite) -Voie urinaire dose-dépendante et réabsorption pH dépendant (20% forme inchangée : excrétion par filtration glomérulaire puis réabsorption et 13% forme métabolisée)

Selon le résultat d'études réalisées sur un modèle *ex vivo* de microsomes hépatiques, les cytochromes CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 sont impliqués dans le métabolisme de la méthadone (tableau 8).

Tableau 8: Principales études évaluant ex vivo sur des microsomes hépatiques humains les cytochromes impliqués dans le métabolisme de la méthadone.

Cytochrome	Etude	Remarques
CYP 3A4	<i>Iribarne et al. 1996</i>	Implication du CYP : ++++
	<i>Moody et al. 1997</i>	
	<i>Foster et al. 1999</i>	++++
	<i>Wang et al.2003</i>	++++
	<i>Gerber et al. 2004</i>	
	<i>Total et al. 2008</i>	S = R
CYP 2B6	<i>Total et al. 2008</i>	Stéréosélectivité, S > R
	<i>Gerber et al. 2004</i>	++++
CYP 2D6	<i>Iribarne et al. 1996</i>	
	<i>Wang et al.2003</i>	
	<i>Eap et al. 1997</i>	
CYP 2C8	<i>Iribarne et al. 1996</i>	
	<i>Wang et al.2003</i>	++: Moindre implication que CYP3A4 pour la R-méthadone mais identique pour la S-méthadone

CYP 2C18	<i>Iribarne et al. 1996</i>	
CYP 2C9	<i>Foster et al. 1999</i>	Pas d'implication des CYP: 1A2, 2A6, 2D6
CYP 2C19	<i>Foster et al. 1999</i>	
	<i>Gerber et al. 2004</i>	CYP 2C19= CYP 3A4
	<i>Total et al. 2008</i>	S << R
CYP 1A2	<i>Eap et al. 1997</i>	

Abréviations: R; R-méthadone, S ; S-méthadone, CYP ; cytochrome.

d- Effets indésirables de la méthadone

La méthadone est un opiacé dont la **marge thérapeutique est étroite** : des décès par surdosage sont possibles, surtout en cas de prise d'héroïne, benzodiazépine et/ou alcool associée. Le décès fait généralement suite à une dépression respiratoire, une hypotension sévère, voire même un état de choc, de coma et d'arrêt cardio-respiratoire (Megarbane 2007). On retrouve principalement ce type de réaction chez les adultes naïfs aux opioïdes ou présentant un faible niveau de tolérance. Une étude récente a montré que l'hypoxémie à l'origine de la dépression respiratoire observée sous méthadone est causée par les récepteurs opioïdes μ et est modulée par les récepteurs κ (Chevillard 2010).

La **constipation et l'hypersudation** sont les deux effets indésirables les plus fréquents et qui persistent fréquemment au long cours (surtout pour des doses > 50 mg/j). Les autres symptômes communs aux morphinomimétiques (euphorie, vertiges, somnolence, nausées, vomissements, sédation, dysurie, œdèmes) sont d'incidence variable, surviennent surtout en début de traitement et ont tendance à s'atténuer après 6 mois. Les traitements par méthadone sont contre-indiqués chez les patients qui souffrent d'insuffisance respiratoire, et nécessitent des précautions particulières en cas d'asthme, d'insuffisance rénale ou hépatique, de diabète, d'insuffisance thyroïdienne ou surrénalienne et d'hypertrophie de la prostate. Au long cours, la question se pose d'effets secondaires hépatiques et/ou endocriniens. Une gynécomastie est rapportée chez 18% des patients traités, 28% ont une hépatomégalie, 11% des œdèmes ; le diabète est plus fréquent que chez des héroïnomanes après un traitement prolongé par méthadone. Par rapport aux héroïnomanes, les troubles de l'érection et de l'éjaculation sont moins fréquents, même si 35% rapportent une libido anormale.

Risque d'allongement de l'espace QT et de torsades de pointes (Tdp): Des allongements de l'intervalle QT à l'électrocardiogramme (ECG) et des Tdp potentiellement mortelles (arythmie

ventriculaire) sous traitement par la méthadone ont été décrits dans le cadre de la prise en charge de la douleur ou la substitution depuis une dizaine d'année (Krantz 2002).

En 2007, l'AFSSAPS classe la méthadone parmi les médicaments à surveillance renforcée ([http://www.afssaps.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-faisant-l-objet-d-une-surveillance-renforcee-au-cours-de-leur-commercialisation/\(offset\)/2](http://www.afssaps.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-faisant-l-objet-d-une-surveillance-renforcee-au-cours-de-leur-commercialisation/(offset)/2)). Il existe un certain nombre de facteurs de risques accroissant le risque de survenue d'effets indésirables cardiaques de la méthadone (tableau 9). La méthadone doit être administrée sous surveillance clinique, électrolytique et électrocardiographique. Cet effet indésirable est un frein à l'augmentation des doses de méthadone chez les patients non répondeurs, en particulier en cas de prise concomitante de benzodiazépines, par exemple.

Tableau 9: Facteurs de risques d'allongement du QT sous méthadone.
(D'après Peles 2007).

Antécédents connus d'allongement du QT (congénital ou acquis)
Antécédents familiaux de mort subite
Posologie supérieure à 120 mg/j
Pathologie cardiaque évoluée
Associations médicamenteuses :
- Médicaments connus pour allonger l'intervalle QT ou entraînant une bradycardie (<i>cf. paragraphe IV.1- interactions médicamenteuses</i>)
- Médicaments connus pour provoquer une hypokaliémie (<i>ex. diurétiques, glucocorticoïdes</i>) ou hypomagnésémie (<i>ex. diurétiques, aminosides, ciclosporine</i>)
- Médicaments inhibiteurs du métabolisme de la méthadone (<i>cf. paragraphe IV.1- interactions médicamenteuses</i>).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'allongement du QT sous méthadone également appelé DI-LQT pour *drug induced QT-prolongation* font intervenir un blocage des canaux ioniques cardiaques responsables de la repolarisation des myocytes cardiaques, en particulier les canaux potassiques hERG=LQTS2 ou LQT2 (*Human ether-à-gogo*) codés par le gène *KCNH2* (Judson 2006) (figure 9).

Le potentiel d'action est la résultante d'un équilibre entre les courants sodiques entrants (phase de dépolarisation des cardiomyocytes) et les courants potassiques sortants (phase de repolarisation). La méthadone bloque certains des canaux potassiques voltage dépendants (notamment le canal hERG) induisant ainsi un retard de la repolarisation cardiaque. Ceci se traduit par une onde T anormale au niveau de l'ECG et un allongement de l'espace QT corrigé à la fréquence cardiaque (QTc) par rapport aux valeurs normales (Goldenberg 2008). Ce retard se traduit cliniquement par des TdP pouvant induire une syncope, voire même une fibrillation cardiaque puis un arrêt cardiaque mortel.

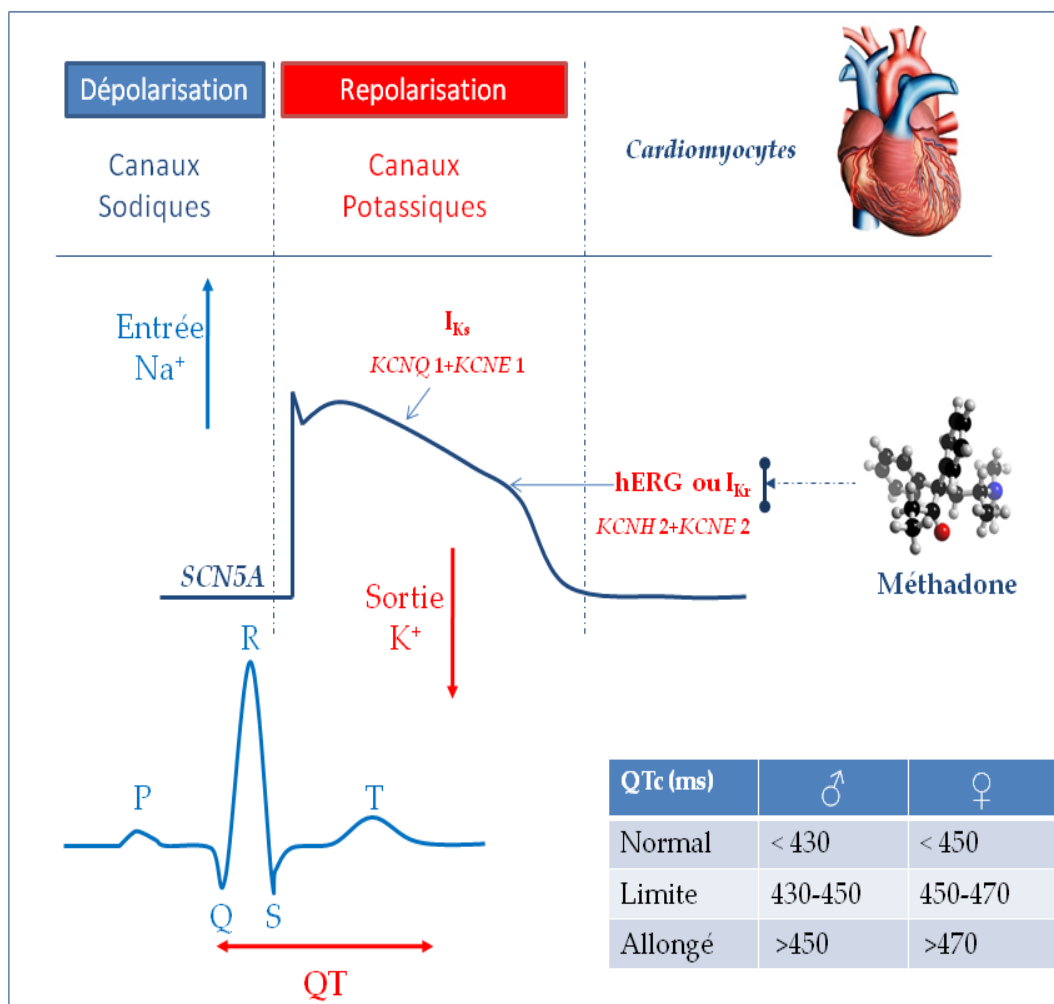


Figure 9: Correspondance entre le potentiel d'action, l'espace QT à l'ECG et les effets des principaux canaux ioniques.

IV- FACTEURS DE VARIABILITE DE LA REPONSE AUX OPIOÏDES

Il existe une grande variabilité interindividuelle de la réponse thérapeutique (doses permettant d'atteindre l'équilibre thérapeutique) et toxicologique (effets indésirables observés sous traitement) à la morphine ou à la méthadone.

Cette variabilité est en partie expliquée par différents facteurs :

- **Facteurs liés au patient:** les facteurs physiopathologiques (âge, sexe, grossesse, pathologies associées, fonctions hépatiques et rénales, sensibilité à la pathologie et la douleur, conduites de délinquance, co-morbidités psychiatriques, consommations multiples de drogues (Coulbault 2006);
- **Facteurs environnementaux:** alimentation, **co-administration de médicaments** ;
- **Facteurs génétiques:** variations qualitatives (polymorphismes ou SNP pour *Single nucleotide polymorphism*, variants génétiques rares) ou quantitatives (nombre de copies) affectant les gènes codant pour des protéines impliquées dans la distribution des médicaments, leur métabolisme (pharmacocinétique) ou codant pour leur(s) cible(s) thérapeutique(s) (pharmacodynamie).

IV.I- INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

La co-administration de médicaments modifiant la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie des opioïdes est à l'origine d'interactions médicamenteuses.

Les interactions pharmacocinétiques résultent le plus souvent d'une modification des concentrations au niveau plasmatique mais également au niveau du site d'action.

IV.1.1- INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA LIAISON AUX PROTEINES PLASMATIQUES

La morphine est faiblement liée aux protéines plasmatiques (de l'ordre de 34 à 37,5%, Olsen 1975), principalement au niveau de l'albumine: les interactions à ce niveau sont de faible importance clinique. La méthadone est quant à elle fortement liée aux protéines plasmatiques, essentiellement au niveau de l'orosomucoïde ou α_1 -glycoprotéine acide (de l'ordre de 77 à 94%, Abramson 1982, Inturrisi 1987, Romach 1981). Or la phénytoïne induit la production d'orosomucoïde. La co-

administration de cette molécule à la méthadone pourrait aboutir à une augmentation de la fraction liée, et par conséquent à une réduction de la fraction libre disponible au niveau du site d'action. La méthadone peut être déplacée *in vitro* de sa liaison à l'orosomucoïde par un certain nombre de molécules, tels le propranolol, la chlorpromazine, la prochlorpérazine, la thioridazine et l'imipramine (Abramson 1982). Cependant, les conséquences cliniques de ces interactions sont faibles puisque les concentrations requises pour le déplacement sont beaucoup plus importantes que celles observées en clinique et qu'à ce jour, aucune interaction au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques n'a été rapportée comme problématique (Lötsch 2002.c). Les conditions physiopathologiques augmentant le taux plasmatique d'orosomucoïde (inflammation) ou la diminuant (insuffisance hépatique, syndrome néphrotique) sont susceptibles cependant de modifier cet équilibre.

IV.1.2- INTERACTIONS AU NIVEAU DES TRANSPORTEURS

La P-gp est un transporteur d'efflux transmembranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*). Ce transporteur est impliqué dans l'élimination intestinale, hépatique et rénale de la morphine et la méthadone (Bouer 1999, Nanovskaya 2005, Thompson 2000, Rodriguez 2004, Mashayekhi 2010). Elle est également impliquée dans la protection de certains tissus (localisation au niveau de la BHE, des barrières hémato-testiculaire et hémato-placentaire ; FDA appendix D, figure 10). De nombreuses études chez la souris et le rat ont montré que la méthadone et la morphine étaient des substrats de la P-gp.

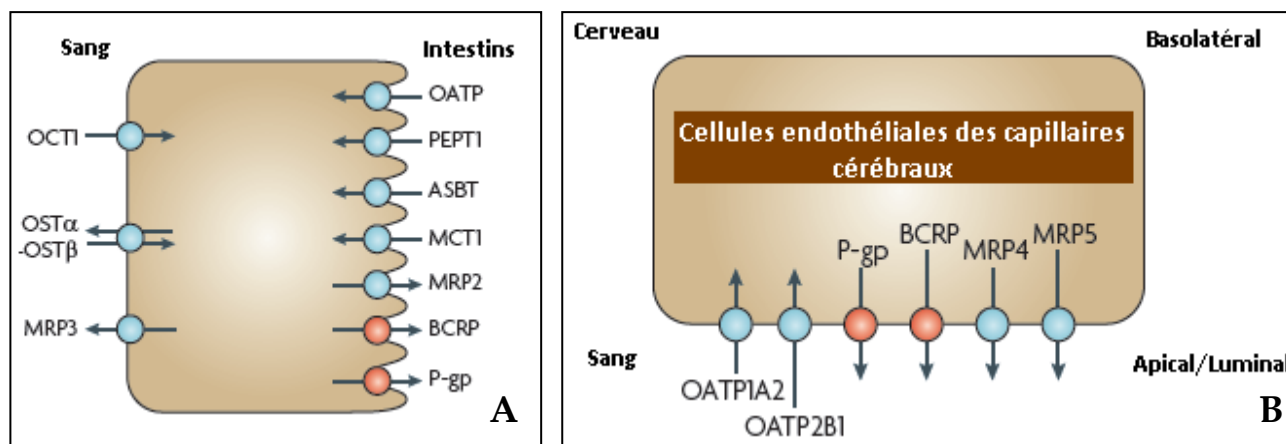


Figure 10: Localisation subcellulaire de la P-gp au niveau des entérocytes (A) et au niveau de la BHE (B).
(Giacomini 2010)

L'expression de la P-gp au niveau intestinal et de la BHE régule le passage cérébral de ces deux molécules (Drewe 2000, Kharasch 2003, Wang 2004, Rodriguez 2004, Marzolini 2004, King 2001,

Xie 1999, Lötsch 2002.a, Huwyler 1998, Wandel 2002). Des études ont montré que l'inhibition de la P-gp augmentait le passage de la morphine au niveau cérébral avec comme conséquence une augmentation de l'activité anti-nociceptive de cette molécule (Xie 1999, Zong 2000, Thompson 2000). Les études évaluant le rôle de la P-gp dans le transport des glucuronides de la morphine sont controversées. En effet, si certaines études *in vitro* (Huwyler 1996, Huwyler 1998) et *in vivo* (Lötsch 2002.a) suggèrent la possible interaction de la M6G avec la P-gp, d'autres estiment que le transport est plutôt médié par d'autres transporteurs de type GLUT-1 ou OATP-2 (Bourasset 2003) mais également par les MRP, surtout MRP2 et MRP3 (Hasegawa 2009).

Des données expérimentales ont montré que la méthadone inhibe le transport de la Rhodamine 123, un substrat de la P-gp, sur des cellules Caco-2 humaine (Stormer 2001) et que la P-gp régule son passage transplacentaire (Nanovskaya 2005). Ce transport s'effectue avec une faible stéréosélectivité vis-à-vis de la S-méthadone (Crettol 2007).

Ainsi, toutes les molécules inhibitrices ou inductrices de la P-gp pourraient moduler le passage de la méthadone et de la morphine au niveau cérébral. Parmi les inhibiteurs connus de la P-gp utilisés en thérapeutique, il y a notamment la cyclosporine A, le kétoconazole, la quinidine, les antiviraux (nelfinavir, ritonavir, saquinavir), le tacrolimus et le vérapamil (FDA appendix D). Ces molécules pourraient théoriquement augmenter les concentrations intracérébrales des opioïdes et leurs effets thérapeutiques et toxiques. Une interaction entre la duloxétine et la méthadone est rapportée dans la partie « résultats ». Concernant les molécules inductrices, deux études ont rapporté le rôle de la rifampicine et de l'indinavir dans l'induction de la P-gp (Hamman 2001, Lin 1999).

IV.1.3- INTERACTIONS AU NIVEAU DU METABOLISME

Les xénobiotiques peuvent subir deux types de réaction de métabolisation :

- les **réactions de phase I**, représentées essentiellement par l'oxydation (qui représente le système le plus puissant *in vivo*) et catalysées par les cytochromes P450 (CYP450). Les cytochromes sont constitués d'une apoprotéine et d'un hème formé d'une porphyrine complexée avec un atome de fer. C'est ce dernier qui confère aux CYP450 leurs propriétés oxydo-réductrices en changeant de valence. Les CYP les plus impliqués dans le métabolisme hépatique des opioïdes, telle la méthadone, sont les enzymes appartenant à la superfamille des CYP450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19...).

- les **réactions de phase II ou de conjugaison** qui permettent de greffer un groupement sur la molécule mère. La glucuronoconjugaison représente une des réactions de cette classe et l'enzyme impliquée dans le métabolisme de la morphine est l'uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférase 2B7 (UGT2B7).

De nombreuses molécules, incluant les médicaments, les drogues illicites et autres xénobiotiques peuvent être des substrats, inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques de cytochromes métabolisant la morphine et la méthadone (Lötsch 2002.c). Ceci se traduit par une modification significative des leurs taux plasmatiques.

a- Interactions via la glucuronoconjugaison

La morphine subit une glucuronoconjugaison par l'UGT2B7. Cette enzyme peut être inhibée par les antidépresseurs tricycliques (Wahlstrom 1994), la naltrexone (Bhargava 1993) ou les ions métalliques Cu^{2+} ou Cd^{2+} (Lawrence 1992). La ranitidine est également capable d'inhiber la glucuronoconjugaison de la morphine en position 3 (Aasmundstad 1998). L'implication clinique de ces interactions n'a cependant pas été explorée (Lötsch 2002.c). Enfin, des différences de niveau de la glucuronoconjugaison ont été décrites suivant l'âge, les enfants ayant une activité enzymatique moindre que celle observée chez les adultes (Court 2010).

b- Interactions via la les réactions d'oxydation médiées par les cytochromes P450 (CYP)

La méthadone est métabolisée essentiellement par le CYP3A4 et à moindre degré par le CYP2D6. De nombreuses interactions entre la méthadone et des molécules associées au traitement de substitution ont été reportées comme cliniquement importantes. Les tableaux 10 et 11 résument les principaux inhibiteurs et inducteurs enzymatiques du CYP3A4 et CYP2D6.

Tableau 10: Principaux inhibiteurs et inducteurs enzymatiques du CYP3A4.
(FDA appendix, <http://www.afssaps.fr>)

Inhibiteurs du CYP3A4
Antibiotiques : ciprofloxacine, clarithromycine, érythromycine, norfloxacine
Antidépresseurs: fluvoxamine*, nefazodone
Antiarythmiques : amiodarone
Antifongiques: fluconazole, itraconazole, ketoconazole*

Inhibiteurs calciques : diltiazem, verapamil

Aliments : Jus de pamplemousse

Anti-acide (Anti-H₂): cimétidine

Antiprotéases (VIH) : indinavir*, nelfinavir, ritonavir*, sequinavir*

Inducteurs du CYP3A4

Antibiotiques : rifabutine, rifampicine**

Anticonvulsivants: carbamazépine, phénytoïne

Barbituriques : phénobarbital, secobarbital

Corticostéroïdes : dexaméthasone, hydrocortisone, prednisolone, méthylprednisolone

Herbes médicinales : Millepertuis (*St. John's wort*)

Antiviraux (VIH) : efavirenz, nevirapine**

Hypoglycémiant : pioglitazone

* Molécules inhibant *in vitro* et *in vivo* le métabolisme de la méthadone (Iribarne 1996, Moody 1997, Kharasch 2004, Geletko 2000).

** Molécules induisant *in vivo* le métabolisme de la méthadone (Raistrick 1996, Heelon 1999, Holmes 1990, Bending 1977).

Tableau 11: Principaux inhibiteurs et inducteurs enzymatiques du CYP2D6.

(FDA appendix, <http://www.afssaps.fr>)

Inhibiteurs du CYP2D6

Antidépresseurs : paroxétine*, fluoxétine*, fluvoxamine, sertraline

Antiarythmiques : amiodarone

Anti-histaminiques (Anti-H₁) : chlorphéniramine, hydroxyzine, prométhazine

Anti-acide (Anti-H₂): cimétidine, ranitidine

Drogues : Cocaïne

Inducteurs du CYP2D6

Antibiotiques : rifampicine

Corticostéroïdes : dexaméthasone

* Molécules inhibant *in vivo* le métabolisme de la méthadone (Bégré 2002 et Eap 1997).

IV.1.4- INTERACTIONS AU NIVEAU DE L'ÉLIMINATION

Certains médicaments sont capables de modifier indirectement les concentrations de méthadone. Le topiramate, par exemple, est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique au niveau rénal et élève le pH

urinaire avec comme conséquence une augmentation de la demi-vie plasmatique de la méthadone. Ainsi, la co-administration du topiramate et de la méthadone peut conduire à des taux plasmatiques de méthadone plus importants.

IV.1.5- INTERACTIONS AU NIVEAU PHARMACODYNAMIQUE

a- Interactions entre opioïdes et AINS

Des études ont montré que la co-administration des AINS et des opioïdes a un effet bénéfique sur le soulagement de la douleur (ce que les auteurs anglo-saxons appellent « *the opioid-sparing effects of NSAIDs* » soit « l'effet d'épargne morphinique des AINS ») (Lötsch 2002.c). Les doses d'opioïdes utilisées pour l'analgésie seraient à réduire quand un AINS est associé en période postopératoire (Grass 1993, Etches 1995, Sutters 1999). Cet effet est surtout observé lors des interventions chirurgicales orthopédiques, dans lesquelles la douleur est associée à des mécanismes inflammatoires et rhumatismaux (Lötsch 2002.c).

b- Interactions au niveau du système nerveux central

Tous les xénobiotiques dépresseurs du système nerveux central comme les benzodiazépines potentialisent l'effet central des opioïdes, notamment le risque de dépression respiratoire.

IV.1.6- INTERACTIONS AU NIVEAU DES CANAUX SODIQUES ET POTASSIQUES CARDIAQUES (METHADONE)

Certaines substances pouvant provoquer des allongements de QT sont très fréquemment consommées par les toxicomanes tels la cocaïne, l'amphétamine ou l'alcool (Hser 2001), de même que les traitements antirétroviraux ou les antipsychotiques. Ces molécules ont été classées suivant la classification d'ArizonaCERT (*Center for Education and Research on therapeutics*, <http://www.torsades.org>, révisée le 14 Juillet 2011) qui permet de distinguer essentiellement trois catégories :

- Les molécules à risque de causer des TdP ; ex : amiodarone, chloroquine, quinidine, halopéridol ;
- Les molécules avec un risque possible d'allongement de l'intervalle QT mais sans association significative à des TdP ; ex : amantadine, atazanavir, clozapine, escitalopram ;

- Les molécules ayant un risque conditionnel de TdP : il s'agit des molécules faiblement associées au risque d'allongement du QT et/ou de TdP. Le risque est faible quand le médicament est utilisé aux doses recommandées et chez les patients sans facteurs de risque ; ex : clomipramine, fluconazole, fluoxétine.

Pour certaines molécules, il existe des preuves substantielles de risque accru chez les femmes (habituellement multiplié par plus de deux). La méthadone fait partie de ce groupe.

La cocaïne est connue depuis longtemps pour sa toxicité cardiaque. Elle bloque les canaux sodiques et potassiques, déprime la fonction cardiaque et peut être à l'origine de TdP et des infarctus du myocarde (Lange 2001, Krantz 2005). L'association avec la méthadone pourrait potentialiser la toxicité cardiaque notamment en terme d'allongement de l'espace QT (Mayet 2010, De Bels 2003, Walker 2003). L'alcool a également été associé à des QT allongés (Zhang 2011).

IV.1.7- CONCLUSION

La plupart des études d'interaction ont été réalisées soit *in vitro*, soit dans le cadre d'expérimentations animales. Peu de ces interactions ont été rapportées en pratique clinique.

La faible liaison de la morphine aux protéines plasmatiques et son métabolisme par glucuronoconjugaison ne sont pas des éléments faisant craindre des interactions médicamenteuses majeures. Par contre, la méthadone est métabolisée par le CYP3A et de nombreuses molécules (notamment les antiviraux) inhibitrices ou inductrices de ce CYP sont administrées en association afin de traiter les pathologies fréquemment associées dans les programmes de substitutions. Ainsi, le risque d'interactions médicamenteuses pouvant avoir une incidence clinique est plus élevé avec la méthadone.

IV.2- PHARMACOGENETIQUE DE LA MORPHINE ET DE LA METHADONE

L'agence européenne des médicaments (EMA *European Medicines Evaluation Agency*) définit la pharmacogénétique comme étant « l'étude des variations au niveau des séquences d'ADN liée à la réponse aux médicaments ». La réponse aux médicaments inclue à la fois les processus d'absorption et de biodisponibilité des médicaments (pharmacocinétique) ainsi que les effets pharmacologiques de ces médicaments en termes d'efficacité (pharmacodynamie) et d'effets indésirables.

IV.2.1- VARIABILITE ET TRANSPORT DES OPIOÏDES

La P-gp est codée chez l'homme par le gène *ABCB1* (ou *MDR1* pour *Multi-drug resistance protein*) situé au niveau du chromosome 7p21. De nombreux SNPs ont été décrits dans la séquence d'*ABCB1* ; le plus fréquemment étudié étant le polymorphisme c.3435C>T (rs1045642). Ce SNP correspond à une variation au niveau de l'exon 26, associé à une réduction de l'expression duodénale de la P-gp chez les porteurs du variant allélique T à l'état homozygote (Hoffmeyer 2000). Des études ont montré que ce SNP pourrait être également associé à une altération de la stabilité ou une réduction des concentrations d'ARNm d'*ABCB1* (Wang 2005, 2006).

Plusieurs études ont recherché le rôle d'*ABCB1* dans la variabilité de la réponse (dose nécessaire à l'analgésie) et des effets secondaires sous traitement par la morphine. Campa et al. ont montré que les porteurs homozygotes CC du SNP c.3435C>T sont de « mauvais répondeurs » par rapport aux patients TT classés comme « bon répondeurs » (n=145 patients italiens, Campa 2008). Les sujets homozygotes TT ont des besoins en morphine inférieurs à ceux des sujets homozygotes CC, et des concentrations intracérébrales supérieures (Meineke 2002, Reyes-Gibby 2007, Lötsch 2009). Récemment, Klepstad et al. ont exploré, chez 2294 patients cancéreux traités par la morphine, 112 SNPs de 25 gènes candidats. Aucun des SNPs étudiés, y compris ceux d'*ABCB1*, n'était significativement corrélé aux doses d'opioïdes administrées (Klepstad 2011).

Coulbault et al. ont montré, chez 74 patients majoritairement caucasiens ayant bénéficié d'une chirurgie colorectale, que les patients porteurs du diplotype sauvage GG-CC des SNPs c.2677G>T/A et c.3435C>T avaient moins de nausées et vomissements (Coulbault 2006). Une étude réalisée chez 32 patients japonais a montré des résultats inverses puisque les porteurs d'au moins un allèle G et un allèle C avaient plus de nausées et de vomissements (Fujita 2011). Des effectifs de patients réduits ainsi que des fonds génétiques différents rendent difficiles la comparaison de ces données.

Dans une population de 245 patients substitués par la méthadone, une relation entre le SNP c.3435C>T et les concentrations plasmatiques de méthadone (R/S) a été rapportée, avec des moyennes de 2,7 ng/mL contre 3,4 pour les patients homozygotes mutés TT et sauvages CC respectivement ($p=0,01$) sans qu'il y ait d'implication dans la réponse au traitement (Crettol 2006). Une autre étude conduite chez 60 patients substitués a montré que la variabilité génétique d'*ABCB1* influence les doses de méthadone (Coller 2006). Levran et al. ont observé des résultats

similaires sur un échantillon de 98 patients (Levrain 2008) ; ils ont montré que les patients présentant le génotype TT-TT-TT (rs1045642, rs2032582 et rs1128503) nécessitaient de doses plus importantes de méthadone. D'autres auteurs n'ont pas trouvé de corrélation entre l'activité centrale de la lévométhadone et les polymorphismes d'*ABCB1* (Lötsch 2006.b).

IV.2.2- VARIABILITE ET METABOLISME DES OPIOIDES

a- Métabolisme de la morphine

Le M6G serait plus efficace que la morphine et produirait moins d'effets indésirables. Il a donc été supposé que les polymorphismes génétiques impliqués dans la glucuronoconjugaison de la morphine pouvaient modifier l'efficacité et la tolérance de la morphine. Deux variants génétiques de *UGT2B7* ont été essentiellement étudiés: *UGT2B7*1* et *UGT2B7*2*. Les fréquences de ces allèles sont de 0,51 and 0,49 dans la population caucasienne (Bhasker 2000). Holthe et al. ont retrouvé une importante variabilité des ratios M6G/morphine and M3G/morphine parmi 70 sujets selon une échelle de dose équivalente à celle des besoins en morphine (Holthe 2002). Cependant les polymorphismes d'*UGT2B7* expliquent peu les ratios observés, ainsi que la tolérance ou l'efficacité de la morphine (Holthe 2002, Coulbault 2006, Holthe 2003, Lötsch 2004). Un polymorphisme dans le promoteur de *UGT2B7*, c.-840G>A, a été associé à une diminution de la glucuronoconjugaison de la morphine chez des patients présentant une drépanocytose (Darbari 2008). L'allèle c.-840A est retrouvé chez 35% des sujets présentant un cancer et traité par morphiniques (n=145) (Holthe 2003). Enfin, une étude récente a montré que les patient porteur de l'allèle *UGT2B7*2* avaient moins de nausées que les non porteurs (Fujita 2011).

b- Métabolisme de la méthadone

Le CYP3A4 assure près de 70% du métabolisme de la méthadone. Une étude américaine portant sur 32 patients substitués par méthadone a montré une corrélation entre l'activité du CYP3A4 mesurée par le test au midazolam IV et l'appartenance à des groupes de doses extrêmes (Shinderman 2003). Une étude plus récente mesurant l'activité du CYP3A4 par le test au midazolam chez 245 patients suisses sous méthadone a retrouvé une relation significative entre l'activité fonctionnelle du CYP3A4 (divisée en basse, moyenne et haute) et la moyenne des concentrations plasmatiques des racémiques R/S (4.3, 3.0, et 2.3 ng/mL; p = 0.0002) (Crettol 2006).

Des études chez des volontaires sains ont montré un rôle des CYP2D6 et CYP1A2 (Kharasch 2004) dans le métabolisme. Chez des patients substitués par la méthadone un rôle a été identifié pour les CYP 2D6, 1A2, 2C9, 2C19 (Bégré 2002).

L'implication du polymorphisme de ces enzymes dans la variabilité des doses de méthadone est controversée. Ainsi, une étude des SNPs de *CYP2B6*, *CYP2C9* et *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP3A5* chez 220 patients à l'équilibre ne retrouvait pas de corrélation entre ces SNPs, les doses administrées, les concentrations plasmatiques de R-méthadone ou la réponse au traitement (Crettol 2005). Par contre, les métaboliseurs ultra-rapides pour le CYP2D6 avaient des taux moyens de méthadone (R/S) légèrement inférieurs à ceux des métaboliseurs intermédiaires ou lents (2,4 contre 3,3 ng/mL, $p = 0,04$) (Crettol 2006). Dans cette étude, les mesures fonctionnelles du CYP3A et du CYP2D6 étaient significativement associées aux concentrations plasmatiques. Ils n'avaient pas d'influence sur la réponse au traitement et uniquement une influence modeste sur les doses orales administrées.

Une étude récente réalisée chez 105 patients substitués par la méthadone (76 patients répondeurs au traitement versus 29 patients non répondeurs) a évalué la corrélation entre des SNPs des *CYP3A5*, *CYP2D6*, *CYP2B6*, *CYP2C9* et *CYP2C19* d'une part et les doses quotidiennes et les concentrations plasmatiques de méthadone d'autre part (Fonseca 2011). Seul le profil métabolique du CYP2D6 était significativement associé aux doses de méthadone, les patients métaboliseurs rapides ayant des doses plus élevées.

Les principales études réalisées *in vivo* sur l'implication des SNPs de ces CYP sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12: Principales études évaluant in vivo les cytochromes impliqués dans le métabolisme de la méthadone.

Etudes SNP	Nb patients *	CYP	Remarques
<i>Eap et al. 2001</i>	256	CYP 2D6 Oui	↑ Conc plasmatiques de R et S Méthadone: PM v/s EM Corrélation mineure: pas de différence si correction des concentrations en fonction de la dose et du poids corporel
<i>Shinderman et al. 2003</i>		CYP3A4 Oui	Corrélation entre l'activité du CYP et les groupes de doses
<i>Crettol et al. 2005</i>	209	CYP 2B6 Non	Modification des concentrations de S-Méthadone
		CYP 2C9 Non	Ni avec les doses administrées, ni la [R-Méthadone] plasmatique ni avec la réponse au traitement
		CYP 2C19 Non	
<i>Crettol et al. 2006</i>	245	CYP 2D6 Oui	UM: [R, S Méthadone] + faibles par rapport aux PM ou IM Pas de corrélation avec la réponse au traitement
		CYP2B6 Oui	CYP2B6*6: ↑ [S-Méthadone]
		CYP 3A4 Oui	Mesure fonctionnelle (midazol oral): [R,S méthadone] plus élevées
		CYP 3A5 Non	
		CYP 1A2 Non	
		CYP 2C9 Non	
		CYP 2C19 Non	
<i>Lotsch et al. 2006</i>	51 VS	CYP3A5 Non	Pas de corrélation avec la réponse au traitement
		CYP2B6 Non	
		CYP1A2 Non	
		CYP2C8 Non	
		CYP2C9 Non	
		CYP2C19 Non	
		CYP2D6 Probable	Taux réduits de CYP2D6: meilleurs résultats que ceux avec activité élevée
<i>Coller et al. 2007</i>	56	CYP 2D6 Non	Pas de corrélation avec la réponse au traitement, doses de methadone ou concentrations plasmatiques
<i>Fonseca et al. 2011</i>	105	CYP3A5 Non	
		CYP2B6 Non	
		CYP1A2 Non	
		CYP2C8 Non	
		CYP2C9 Non	
		CYP2C19 Non	
		CYP2D6 Oui	Doses de methadone chez UM > EM ou PM

* Les patients inclus sont des patients traités par la méthadone, seule l'étude de Lotsch et al. 2006.b a été réalisée chez des volontaires sains (VS).

Abréviations: EM=Extensive metabolizers ou métaboliseurs normaux, IM=Intermediate metabolizers ou métaboliseurs intermédiaires, PM=Poor metabolizers ou métaboliseurs lents, UM=Ultrarapid metabolizers ou métaboliseurs ultrarapides.

IV.2.3- VARIABILITE ET PHARMACODYNAMIE DES OPIOÏDES

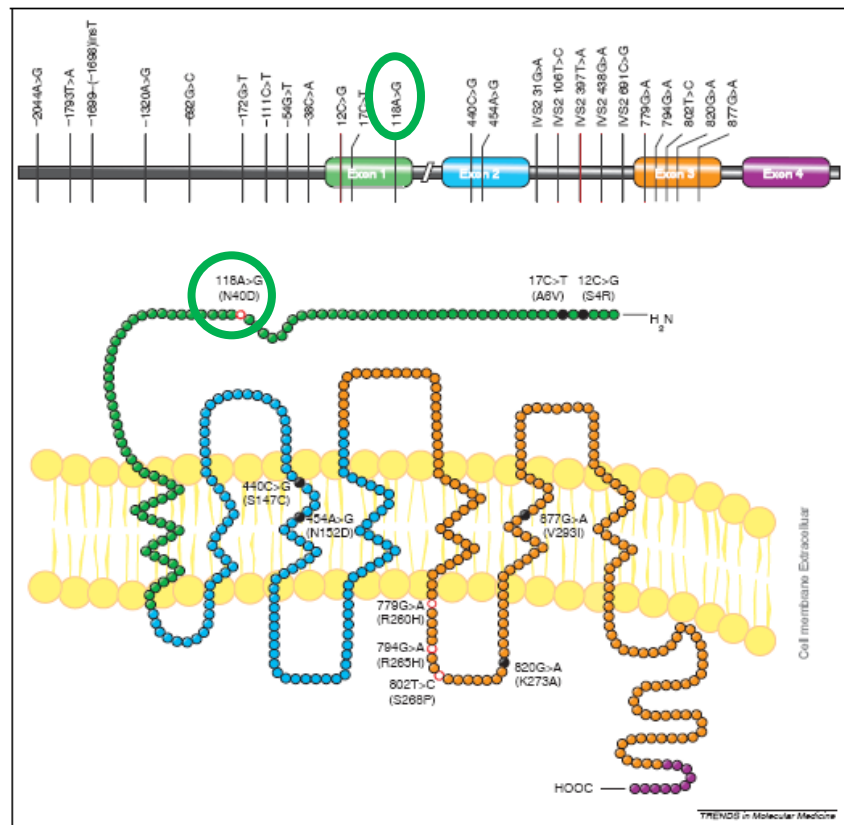
OPRM1 code le récepteur opioïde μ (MOR= *Mu Opioid Receptor*), site d'action primaire des peptides opioïdes endogènes tels que la β -endorphine mais aussi de la morphine, de l'héroïne, et de la méthadone (Kreek 2005). A ce jour, près de 100 variants alléliques d'**OPRM1** ont été identifiés, une vingtaine induisant un changement d'acide aminé (mutation faux sens) et sont décrits avec une fréquence allélique supérieure à 1% (Figure 11).

Figure 11: Représentation schématique du gène **OPRM1** (en haut) et du récepteur μ .

Au niveau du gène sont représentés 24 variants ayant des conséquences fonctionnelles au niveau de l'ARNm ou de la protéine.

Les acides aminés sont symbolisés par des cercles, les couleurs étant associées aux exons qui les codent.

Les cercles noirs représentent des polymorphismes et les cercles rouges indiquent la présence de variants fonctionnels. Les variations sont indiquées au niveau nucléotidique (Lötsch 2005.b).



Une attention particulière a été apportée au SNP c.118A>G (rs1799971) ; ce dernier entraîne la substitution d'une asparagine par un acide aspartique en position 40 (p.Asn40Asp). Ce SNP aboutit à la suppression d'un site de N-glycosylation dans la partie extracellulaire du récepteur sans toutefois modifier sa structure tertiaire. La forme mutée Asp40 présente une affinité pour la β -endorphine 3,5 fois plus élevée que pour la forme sauvage Asn40, sans qu'il y ait toutefois une modification de l'affinité pour les autres opioïdes endogènes (met- et leu-enképhaline, endomorphine-1 et -2) et pour les opioïdes exogènes (morphine, fentanyl, méthadone et naloxone) (Bond 1998). Des études *in vitro* ultérieures n'ont pas confirmé les changements d'affinité de liaison aux morphiniques en présence de l'allèle G (Befort 2001, Beyer 2004). Sur des modèles de

culture primaire de cortex cérébral et de cellules d'ovaires de hamster chinois transfectées, le variant allélique G a été associé à un taux d'ARNm et un taux de protéines MOR plus faibles (Zhang 2005).

De nombreuses études ont évalué l'effet de ce SNP sur la réponse à la morphine et la M6G administrées par voie IV chez des volontaires sains de faible effectif. Lötsch et al. ont ainsi démontré, en utilisant la taille pupillaire comme marqueur de la réponse thérapeutique, que les valeurs des concentrations efficaces à 50% (EC50) de la M6G étaient de 714 nmol/L pour les individus 118AA, contre 1475 nmol/L pour les individus 118AG et 3140 nmol/L pour les individus 118GG (Lötsch 2002.d). Une étude similaire, employant la douleur électrique comme modèle expérimental chez des volontaires sains a répliqué ces résultats et a trouvé des résultats comparables pour la morphine (Skarke 2003). D'autres études ont montré que les porteurs de l'allèle 118G avaient un effet analgésique moindre après administration de la morphine par voie orale sans protection contre la survenue de dépression respiratoire (Romberg 2005) ou une protection accrue contre l'effet toxique de la M6G (Lötsch 2002.b).

De nombreuses études ont évalué l'association de ce SNP à la réponse à la douleur, aux doses requises pour le soulagement de la douleur ainsi qu'aux effets secondaires observés sous traitement. Les résultats sont résumés dans le tableau 13. Ainsi, la majorité des études ont montré que les l'allèle G était associé à des scores de douleurs plus élevés (diminution des seuils de douleur) ainsi qu'à une diminution de la réponse à la morphine administrée en postopératoire aigu ou en chronique.

En ce qui concerne la méthadone, Lötsch et al. dans une étude sur 51 volontaires sains, ont mis en évidence une corrélation entre le SNP *c.118A>G* et l'activité centrale de la (R)-méthadone (évaluée par mesure du diamètre des pupilles) après administration orale unique de 0,075mg/kg de (R)-méthadone (Lötsch 2006.a). Cette dernière était capable d'induire 1,75 fois moins de myosis (en moyenne) chez les porteurs de l'allèle 118G par rapport aux porteurs de l'allèle sauvage. Ces résultats restent controversés puisqu'une étude de Compton et al. ne retrouve pas de différence significative de répartition de trois SNPs du récepteur opioïde μ (dont le SNP *c. 118A>G*; Compton 2003).

Tableau 13: Principales études évaluant le rôle du SNP c.118A>G d'OPRM1 dans la douleur et le traitement par la morphine.

(Adapté Mague 2010, Walter 2009)

Etude	Patients H/F ¹	Contexte de la douleur	Implication dans l'intensité de la douleur	Implication dans la dose de morphine	Implication dans les effets secondaires	Remarques
Klepstad et al. 2004	62/37	Cancer	N	O	-	Patients GG (n=4): doses de morphine plus élevées v/s AA et AG
Chou et al. 2006.a	0/80	Postopératoire obstétricale	N	O	- ²	Patients GG : doses de morphine plus élevées v/s AA
Chou et al. 2006.b	31/89	Postopératoire orthopédique	-	O	-	Patients GG : doses de morphine plus élevées v/s AA et AG
Coubault et al. 2006	74	Postopératoire colorectale	-	N	-	Nb de patients GG faible
Reyes-Gibby et al. 2007	116/91	Cancer	N	O	-	Patients GG et AG : doses de morphine par 24h plus élevées v/s AA
Sia et al. 2008	0/588	Postopératoire obstétricale (postcésarienne)	O	O	O	- Patients AA : doses de morphine par 24h plus faibles v/s AG et GG - Patients AA : scores de douleur les plus faibles - Patients AA : plus de nausées
Huehne et al. 2009	29/32	Postopératoire	N	N	-	
Hayashida et al. 2008	79/59	Postopératoire	-	O	-	Patients GG : doses de morphine par 24h plus élevées v/s AG et AA
Lötsch et al. 2009	156/196	Chronique	O	N	N	Patients GG : scores de douleur plus élevés

Abréviations: H : Hommes, F : Femmes, O : Implication, N : Pas d'implication, v/s : versus.

¹ Les chiffres représentent le nombre de patients.

² L'implication n'a pas été évaluée dans l'étude.

IV.2.4- VARIABILITE ET CIRCUIT DE RECOMPENSE

Des SNP des gènes impliqués dans la cascade dopaminergique pourraient modifier la pharmacodynamie des opioïdes en diminuant la stimulation naturelle du circuit de récompense. La cascade dopaminergique a été associée aux conduites addictives dans la littérature (Figure 12).

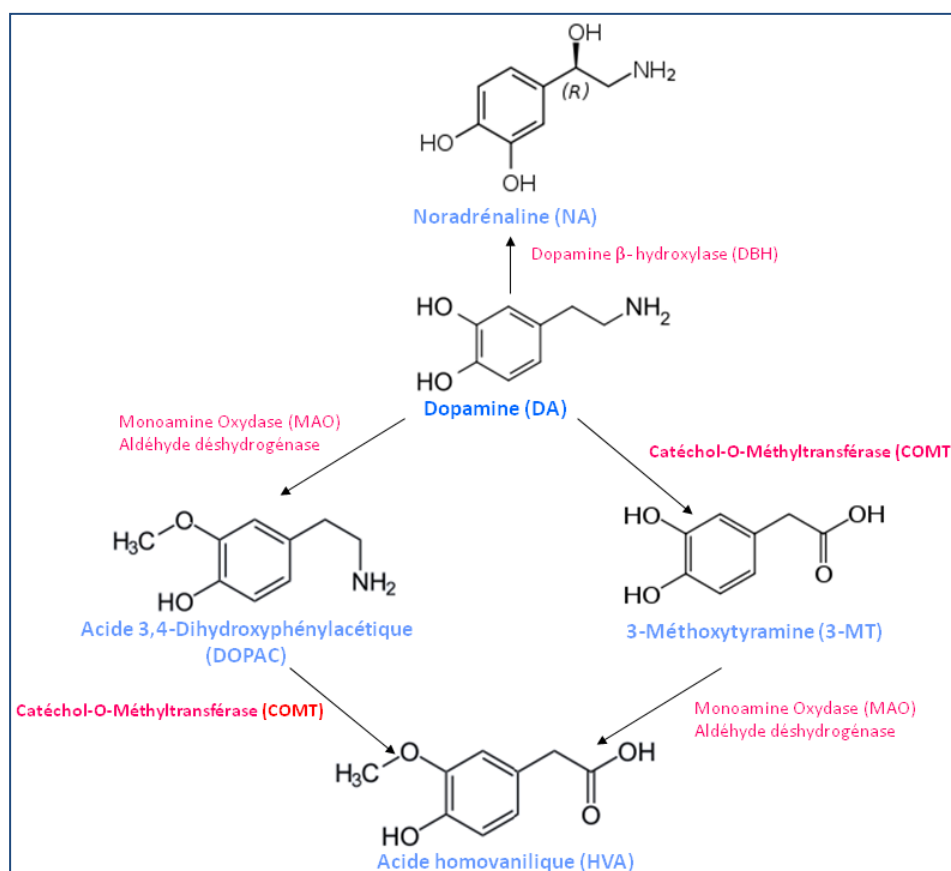
De nombreux SNP du gène **DRD2**, qui code le récepteur D2 de la dopamine, ont été associés à la dépendance à l'héroïne (pour revue, Noble 2000). Le SNP le plus étudié dans la dépendance aux opiacés est une variation nucléotidique nommée TaqIA (rs1800497) du nom de l'enzyme de restriction qui coupe l'ADN au niveau de cette séquence selon le polymorphisme nucléotidique. Depuis sa description initiale, ce SNP a été reconnu comme appartenant en réalité à un gène nouvellement identifié au voisinage de **DRD2**, le gène **ANKK1** (Garrido 2011). L'allèle A1 (ou T) et le génotype homozygote A1A1 (TT) ont été fortement associés à la vulnérabilité à la dépendance pour l'héroïne chez des caucasiens (Doehring 2009, Perez de los Cobos 2007). Néanmoins, l'association entre ce SNP, le maintien dans les programmes de substitution et la prédiction de la dose de méthadone reste controversée (Lawford 2000, Crettol 2008.a). Le SNP c.957C>T situé dans l'exon 7 de **DRD2** (rs6277) a également été associé à l'usage d'héroïne chez des patients caucasiens (Doehring 2009). Les porteurs de l'allèle variant T produisent un ARN messager (ARNm) moins stable (Duan 2003). Or, il semblerait que les sujets présentant une activité réduite du récepteur DRD2 chercheraient à compenser ce déficit par la prise de drogues (Noble 2000).

La dopamine est dégradée principalement par deux enzymes : la Catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et la monoamine oxydase (MAO) (Figure 12).

La COMT est l'enzyme de dégradation des monoamines cérébrales, principalement dopamine et noradrénaline. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 22q11. La substitution c.472G>A, aussi nommée p.Val158Met, dans le gène **COMT** est responsable d'une modification de l'activité enzymatique : les patients porteurs de l'allèle Valine auraient une enzyme jusqu'à quatre fois plus active que les porteurs de l'allèle Méthionine (Lachman 1996, Lotta 1995).

Zubieta et al. ont montré que les patients homozygotes 158Met/Met présentent une sensibilité plus élevée à la douleur et une plus forte densité des récepteurs opioïdes au niveau cérébral (Zubieta 2003). Chez les patients cancéreux, les patients Met/Met requièrent des doses plus faibles de morphine (Rakvag 2005, Reyes-Gibby 2007). Les résultats de ces études semblent discordants puisque les patients Met/Met ont des scores de douleur plus élevés mais requièrent des doses plus faibles de morphine. Une hypothèse avancée par les auteurs est que l'augmentation de la quantité des récepteurs opioïdes centraux observée chez les patients Met/Met pourrait expliquer l'efficacité accrue de la morphine chez les porteurs de ce génotype (Rakvag 2008). Enfin, une étude réalisée chez des patients cancéreux n'a pas trouvé de corrélation entre le SNP de *COMT* d'une part et la dose de morphine ainsi que sa concentration plasmatique et celle de ses métabolites d'autre part (Ross 2008).

Figure 12: Cascade du métabolisme des catécholamines au niveau central.



La COMT et la MAO sont des enzymes du catabolisme de la DA. Elles métabolisent respectivement la dopamine en 3-MT, et DOPAC. L'acide homovanillique est un métabolite secondaire. La DBH transforme la DA en NA au niveau des neurones noradrénergiques.

Concernant les effets secondaires, une étude récente réalisée sur 1579 patients cancéreux avait montré entre autres, que le SNP p.Val158Met de *COMT* était associé aux nausées et

vomissements observés sous traitement, les porteurs d'au moins un allèle Val ressentant les symptômes nauséux avec une intensité plus faible (Laugsand 2011).

La dégradation excessive de la dopamine, due à l'augmentation de l'activité enzymatique de la COMT, pourrait induire une vulnérabilité aux substances addictives et donc être associée à la dépendance (Vandenbergh 1997, Horowitz 2000). Ainsi, les porteurs de l'allèle 158Val chercheraient à compenser la faible stimulation naturelle de leur circuit de récompense par la prise de substance addictive rétablissant le niveau de dopamine au niveau central.

La noradrénaline, issue de la dégradation de la dopamine par la dopamine- β -hydroxylase (DBH), joue un rôle essentiel dans les effets renforçant de nombreux produits addictifs dont les opiacés (Jasmin 2006) via les projections noradrénergiques du cortex préfrontal et de la VTA vers le NAc (Ventura 2003). Des SNPs dans le gène *DBH* ont été associés à des variations des concentrations plasmatiques de l'enzyme. Ainsi le variant fonctionnel T du rs1611115 a été associé à la variabilité de l'activité plasmatique de la DBH (Zabetian 2001), l'allèle T étant associé à une plus faible activité de l'enzyme et par conséquent une concentration de dopamine plus élevée.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

► OBJECTIFS GENERAUX DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Afin de mieux comprendre les variabilités interindividuelles des traitements par les opioïdes, nous nous sommes intéressés aux facteurs potentiellement à l'origine de cette variabilité pour deux molécules, la morphine et la méthadone.

Les objectifs ont été de rechercher si :

- (i) des marqueurs génotypiques et cliniques pouvaient être associés à la variabilité de réponse à la morphine chez des patients en postopératoire ;**
- (ii) des marqueurs génotypiques pouvaient être associés à la variabilité de réponse à la morphine chez des patients obèses ;**
- (iii) des marqueurs génotypiques peuvent être associés à la variabilité de réponse à la méthadone.**

I- VARIABILITE DE LA REPONSE A LA MORPHINE

La variabilité interindividuelle d'efficacité des opioïdes, notamment dans le traitement de la douleur postopératoire, conduit à varier les doses nécessaires pour soulager la douleur et expose à un risque de survenue des effets indésirables.

De multiples facteurs permettent d'expliquer cette variabilité, mais il n'existe pas à ce jour d'autres outils que la surveillance clinique pour trouver l'équilibre entre le degré d'antalgie et la survenue d'évènements indésirables et, par conséquent, aucun moyen de prédire *a priori* la dose adaptée au patient (Lloret Linares 2009).

A ce jour, il n'existe pas de conclusions claires et plausibles de l'implication des facteurs génétiques dans la variabilité observée. Nous avons ainsi voulu explorer dans cette première partie la pharmacogénétique de la réponse à la morphine de deux groupes distincts de patients, placés dans des contextes cliniques différents :

- un protocole a été mis en place au Liban visant à explorer l'usage de la morphine dans le traitement de la douleur aigue postopératoire chez des patients subissant des chirurgies abdomino-pelviennes douloureuses.
- un second volet a été réalisé en France chez des patients obèses exposés à des douleurs chroniques, notamment articulaires, liées à leur surpoids.

I.1- VARIABILITE DE LA REPOSE A LA MORPHINE EN PERIODE POSTOPERATOIRE- RECHERCHE DE L'IMPLICATION DE FACTEURS GENETIQUES

Dans le cadre de mon travail de thèse à Beyrouth, j'ai conçu et mis en place un projet mis en place dans la perspective d'optimiser la prise en charge de la douleur chez les patients en période postopératoire et intitulé « **Facteurs génétiques associés à la réponse à la morphine en période postopératoire** ».

Ce projet s'est fixé comme objectif d'identifier des facteurs de variabilité cliniques et génotypiques associés d'une part à la dose de morphine administrée dans les 48 h en postopératoire et d'autre part aux effets secondaires sous traitement¹. L'accord du comité d'éthique de l'Université Saint-Joseph a été obtenu en Juillet 2009 (Protocole N.256 bis, dépôt en Novembre 2008). Les inclusions ont débuté en Octobre 2009 au sein de l'équipe d'Anesthésie-Réanimation du Pr Yazbeck (Responsable scientifique : Dr Naccache).

La thèse m'a offerte l'opportunité de développer ce projet de recherche clinique depuis sa rédaction initiale (avec le soutien du Pr Khabbaz), sa soumission auprès du comité de l'éthique, de la direction de l'hôpital et de l'équipe d'anesthésie, l'obtention des autorisations jusqu'à l'acquisition et l'interprétation des génotypages (Liban). Sur le plan technique, j'ai procédé aux extractions d'ADN, à la tenue d'une banque d'ADN et aux génotypages réalisés par différentes techniques (PCR en temps réel (Liban) et PCR couplée à la dHPLC (France)). J'ai également été amenée à mettre au point le séquençage des régions codantes du gène *OPRM1* (France).

Un objectif secondaire a été d'adapter et transférer les techniques de génotypages par PCR en temps réel de polymorphismes de gènes d'intérêt, mises au point dans le cadre de mon Master de recherche en pharmacologie (France)², au laboratoire de Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique (Liban)³. J'ai validé ce transfert technologique en comparant mes résultats à ceux obtenus sur un amplificateur différent et en utilisant une chimie différente à Paris.

¹ Financement par le Conseil de la recherche de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (FP32) en Août 2010.

² M2 Recherche Pharmacologie préclinique et clinique du Pr Plotkine -Paris Descartes.

³ Faculté de Pharmacie, Université Saint-Joseph.

I.1.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE ET HYPOTHESE DE TRAVAIL

Il existe une grande variabilité interindividuelle des doses de morphine auto-administrées par le patient pour le contrôle de sa douleur. Nous avons voulu savoir si cette réponse était modulée par des facteurs génétiques en examinant les gènes candidats suivants :

- *OPRM1* : des variants nucléotidiques modifiant l'affinité de la morphine pour le récepteur opioïde μ ont été associés dans la littérature à la réponse à la douleur, aux doses requises pour l'antalgie ainsi qu'aux effets secondaires observés sous traitement (Shabalina 2009). Deux approches ont été combinées afin d'explorer ces **variants nucléotidiques**: une approche ciblée avec **génotypage** systématique pour le SNP c.118A>G d'*OPRM1* et une approche plus globale d'étude d'*OPRM1* avec criblage de variants nucléotidiques par dHPLC, suivi de **séquençage**.
- *COMT* : la COMT en modulant le taux de dopamine central semble également jouer un rôle dans la régulation de la sensibilité à la douleur et dans la détermination des doses antalgiques de morphine (*cf. chapitre IV, Facteurs de variabilité de la réponse aux opioïdes*). Le polymorphisme p.Val158Met de *COMT* qui module l'activité de l'enzyme a été étudié
- *ABCB1* : la P-gp est une pompe d'efflux limitant le passage intestinal et cérébral de la morphine. Le génotypage systématique du polymorphisme c.3435C>T de *ABCB1* a également été conduit en parallèle afin d'explorer la part **pharmacocinétique** de la variabilité.

I.1.2- PATIENTS ET METHODES

Il s'agit d'une étude clinique prospective mono-centrique de recueil de variables phénotypiques et génotypiques chez des patients admis pour des chirurgies douloureuses et traités par la morphine pour la douleur en postopératoire.

Tous les patients ont donné leur consentement écrit. Les patients présentant une insuffisance rénale (clairance de la créatinine calculée selon la formule de Cockcroft inférieure à 40 mL/min) et les patients traités par des analgésiques opioïdes, des corticostéroïdes ou des AINS en préopératoire n'ont pas été inclus dans l'étude (pour éviter essentiellement l'effet d'épargne morphinique). Les patients traités par d'autres médicaments n'ont pas été exclus, mais la consommation de benzodiazépines et d'antidépresseurs a été signalée sur la fiche d'inclusion.

Avant l'intervention, des données cliniques ont été recueillies et les prélèvements sanguins ont été réalisés pour analyse génétique. Quarante-quatre patients ont été inclus dans cette première analyse.

L'anxiété a été évaluée au bloc opératoire avant l'opération (suivant une échelle de 0 à 100). Tous les patients ont reçu une anesthésie générale standard, comprenant le N₂O, des gaz halogénés, du fentanyl et des myorelaxants. En salle de réveil, ils ont également reçu de la morphine avant l'extubation (0,05-0,1 mg/kg) ainsi qu'une dose de titration jusqu'à ce que l'EVA soit inférieure ou égale à 3 sur 10. En période postopératoire, les patients ont reçu la morphine par pompe (PCA⁴) et du paracétamol 1 g par IV toutes les 6 h et un suivi sur 48 h a été réalisé (*cf. Annexe 1: protocole de recherche, fiche d'inclusion et fiche de suivi*). L'évaluation de la douleur a été réalisée selon l'EVA au repos et au mouvement. La dose administrée était de 2 mg toutes les 8 min si l'EVA était supérieure ou égale à 4. En cas d'inefficacité persistante (EVA supérieure ou égale à 4 sur 10), une dose de 3 mg toutes les 10 min était administrée en deuxième intention.

Différentes échelles ont permis d'évaluer les effets secondaires de la morphine (sédation, nausées et vomissements ; tableau 14). La dépression respiratoire et la bradycardie ont été évaluées suivant le critère qualitatif absence/présence (oui/non : O/N).

Tableau 14: *Echelles d'évaluation de la sédation et de l'intensité des nausées sous morphine.*

<i>Evaluation de la sédation</i>	
0	Réveillé
1	Répond à l'appel
2	Répond à une stimulation tactile
3	Répond à une stimulation douloureuse
4	Ne répond pas
<i>Evaluation de l'intensité des nausées</i>	
0	Pas de nausées
1	Nausées légères à modérées
2	Nausées sévères nécessitant la prise d'antiémétiques

⁴ Les frais de la PCA ont été pris en charge par le Conseil de la recherche de l'USJ.

a- Génotypage (Liban)

L'ADN a été extrait à partir du sang total (leucocytes circulants) recueilli sur EDTA avec le kit QIAamp DNA Mini[®] Blood (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

Les génotypes des SNPs c.118A>G d'*OPRM1*, de p.Val158Met de *COMT* et de c.3435C>T d'*ABCB1* ont été réalisés par PCR en temps réel sur Lightcycler 2.0 (Roche ; Liban). Ces techniques ont été validées durant mon stage de M2 comme mentionné plus haut.

i- Principe

La détermination des génotypes est réalisée par une technique de PCR en temps réel avec hybridation à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques (sondes FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfert*), suivie d'une analyse des courbes de fusion sur LightCycler.

Elle se déroule en deux temps :

- ▶ Amplification de la zone d'intérêt du gène (qui comporte le variant nucléotidique)
- ▶ Fusion: permettant de détecter la présence ou l'absence du variant nucléotidique par déshybridation des sondes fluorescentes.

ii- Protocole opératoire

Brièvement, la réaction est réalisée à partir de 25 ng d'ADN (solution à 10ng/μL soit 2,5 μL) dans un volume final de 10 μL (eau pour préparation injectable ou ppi qsp), contenant 1 μL de mélange réactionnel (Taq polymérase Fast Start (10x), tampon et dNTP ; Lightcycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes[®] Kit- Roche Diagnosis), 1,2 μL de MgCl₂ (10mM), et 0,2 μL de chacune des amorces (20 mM) et des sondes fluorescentes (20 mM) (TIB[®] Molbiol) (tableau 15). Les génotypes d'*OPRM1* (rs1799971) et *ABCB1* (rs1045642) ont été réalisés selon les techniques publiées dans la littérature (Grösch 2001, Nauck 2000). Les amorces utilisées pour le génotypage de p.Val158Met (ou c.472G>A; *COMT* rs4680) ont été choisies en utilisant le logiciel Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). La mise au point de la technique est présentée dans l'article suivant (A Hajj, K Peoc'h, F Hajj Moussa, JL Laplanche, L Rabbaa Khabbaz, **Rapid detection of p.Val158Met *COMT* polymorphism**

using fluorogenic hybridization probes. Soumis le 9 Février 2012 à *Molecular Biology Reports*). La liste des amorces est présentée en annexe 2.

iii- Conditions opératoires

Les conditions d'amplification ont été déterminées à partir des protocoles du fabricant, de la séquence des amorces choisies (détermination de la température d'hybridation selon la température de fusion -T_m- théorique). Pour optimiser les résultats de la PCR, différentes températures d'hybridation, différentes courbes de fusion et un nombre variable de cycles ont été testés. L'ensemble de ces conditions est résumé dans le tableau 15.

Tableau 15 : Conditions d'amplification et des courbes de fusion pour le génotypage de OPRM1, ABCB1 et COMT.

	CONDITIONS DE LA PCR				CONDITIONS DES COURBES DE FUSION	
	DENATURATION	HYBRIDATION	ELONGATION	CYCLES	REDUCTION DES TEMPERATURES	ELEVATION DE TEMPERATURE
OPRM1 c.118A>G	10 s à 95°C	15 s à 55°C	10 s à 72°C	45	90 s à 40°C	De 40°C à 80°C à 0,2°C/s
ABCB1 c.3435C>T	10 s à 95°C	15 s à 54°C	10 s à 72°C	45	90 s à 40°C	De 40°C à 80°C à 0,2°C/s
COMT P.VAL158MET	10 s à 95°C	15 s à 51°C	10 s à 72°C	45	90 s à 40°C	De 40°C à 80°C à 0,05°C/s

iv- Lecture et analyse des résultats

La détection des SNPs est faite par analyse des courbes de fusion sur le logiciel Lightcycler (figure 13).

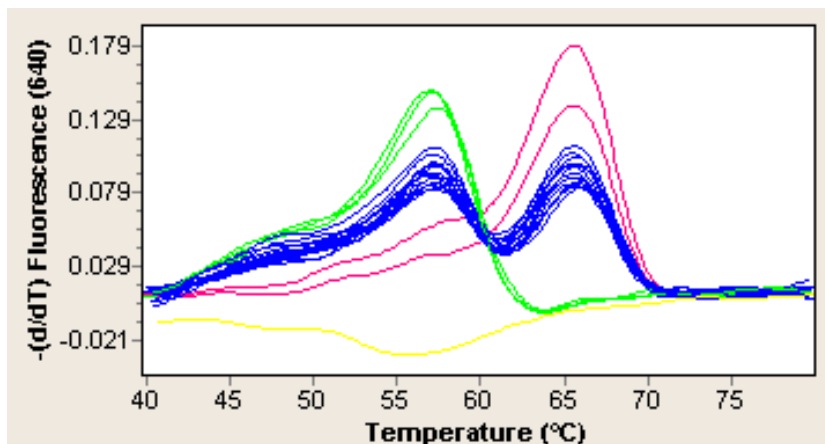


Figure 13: Génotypage du SNP c.C3435T d'ABCB1 à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques.

Les courbes de fusion permettent de distinguer trois profils:

- Profil homozygote CC (courbes rouges): le pic de fusion (T_m) est obtenu à 66°C
- Profil hétérozygote CT (courbes bleu) avec deux pics de fusion, l'un correspondant à l'allèle 3435C (à 66°C) et l'autre à l'allèle 3435T (à 57,5°C)
- Profil homozygote TT (courbes vertes): le pic de fusion est obtenu à 57,5°C.

b- dHPLC et séquençage (France)

Pour 30 patients inclus (patients pour lesquels l'ADN a été transféré du laboratoire libanais au laboratoire français), un criblage par dHPLC puis séquençage d'*OPRM1* a été réalisé. Nous avons choisi d'étudier cinq exons d'*OPRM1* : les exons 1, 2 et 3 qui sont conservés dans la totalité des variants d'épissage, l'exon 4 qui code pour le variant d'épissage hMOR-1 (NM_000914.2) et l'exon O du variant d'épissage hMOR-1O (NM_001008503.1).

i- Principe

Ces techniques nécessitent trois étapes :

- ▶ Amplification sélective du fragment d'intérêt par PCR.
- ▶ Analyse des produits de PCR par dHPLC (Wave[®] Transgenomic Nucleic Acid Fragment Analysis System).
- ▶ Séquençage des patients présentant un profil anormal en dHPLC (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Les amorces utilisées pour la PCR ont été choisies en utilisant le logiciel Primer 3 (Annexe 3).

ii- Protocole et conditions opératoires : PCR

Pour optimiser les résultats de la PCR, différentes températures d'hybridation et un nombre variable de cycles ont été testés. L'amplification est réalisée à partir de 50 ng d'ADN dans un volume final de 50 µL en présence d'1 µL d'une Taq Polymérase Gold (5 UI/mL ; ampliTa[®] Hot Start Roche, qui est une polymérase qui nécessite pour son activation d'une étape d'élévation de la température avant de débiter la réaction de PCR), de 5 µL de tampon 10X, 3 µL de MgCl₂ (25mM, Roche), 5 µL de dNTP désoxyribonucleotides triphosphate à 2 mM chaque (Pharmacia, qui est un mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)) et des amorces (1,5 µL de l'amorce sens et 1,5 µL de l'amorce anti-sens à 10 µmol/µL chaque).

Les conditions d'amplification sont données dans le tableau suivant.

Tableau 16: Conditions d'amplification par PCR d'OPRM1, ABCB1 et COMT

	DUREES DES CYCLES, NOMBRE, TEMPERATURE			
	DENATURATION	HYBRIDATION	ELONGATION	CYCLES
<i>OPRM1</i> c.118A>G	9 min à 94°C	30 sec à 94°C 30 sec à 59°C 30 sec à 72°C	72°C pour 7 min	30
<i>ABCB1</i> c.3435C>T	9 min à 94°C	30 sec à 94°C 30 sec à 57°C 30 sec à 72°C	72°C pour 7 min	35
<i>COMT</i> p.VAL158MET	9 min à 94°C	30 sec à 94°C 30 sec à 60°C 30 sec à 72°C	72°C pour 7 min	35

La vérification de la taille des fragments obtenus par PCR est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et visualisés sous lumière ultra violette après avoir incubation du gel dans une solution d'agent intercalant fluorescent (Syber Safe ; Invitrogen®), en tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X.

iii- Protocole et conditions opératoires : Séquences

Les produits de PCR sont purifiés sur colonne (Kit QIAGEN® QIAquick). Pour la réaction de séquence, 1 µL d'une solution diluée d'amorce à 10 µmol/µL, 1 µL de BigDye® Terminator, qui contient les nucléotides marqués par différents fluorochromes, 3,5 µL de tampon 5X sont mélangés sous un volume réactionnel de 20 µL. 1,5 µL de produit de PCR purifié est finalement ajouté. La réaction se fait à 4°C et à l'abri de la lumière vive (papier aluminium). La réaction de séquence est menée sur un amplificateur selon les recommandations du fabricant (5 minutes à 96°C, 10 secondes à 98°C et 4 minutes au Tm des amorces, sur 25 cycles). Les produits de séquences sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion sur une colonne Sephadex G50 qui permet de retenir les ddNTP libres en excès qui pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques (multiscreen MicroAmp® Optical 96-Well). Les produits purifiés sont ensuite séparés sur capillaire, utilisant un polymère de séparation pop6-ABI (séquenceur 3130 Applied Biosystems). L'analyse des chromatogrames sur le logiciel SeqScape v.2.6 (Applied Biosystems) permet d'identifier d'éventuels variants nucléotidiques. Ces résultats sont ensuite reportés sur le logiciel Alamut (Intégrative Biosoftware), afin de rechercher l'impact des variants identifiés sur la séquence protéique et l'épissage.

c- Analyse statistique

Les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (KW) et de Mann-Whitney (MW) ont été utilisés afin de comparer les valeurs entre les différents sous-groupes en utilisant le logiciel SPSS version 16.0. L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé en utilisant le test du χ^2 . La différence statistique entre les différentes fréquences génotypiques et alléliques a été déterminée par des tests du χ^2 ou le test exact de Fisher. Les valeurs de p sont présentées avec et sans la correction d'Holm (1979) appliquée aux comparaisons multiples. Une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Les doses de morphine sont présentées par la médiane accompagnée des valeurs extrêmes (entre crochets).

I.1.3- RESULTATS

A- CARACTERISTIQUES DES PATIENTS

Les inclusions de patients dans ce protocole se poursuivent actuellement ; nous présentons l'analyse des résultats de 44 patients traités par PCA en postopératoire ; l'objectif final est d'inclure 100 patients. Les principales caractéristiques cliniques et démographiques des patients sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17: Données démographiques et cliniques des patients.

	Patients en postopératoire n= 44
Nombre de patients : Femmes Hommes	28 (63,6) ⁽¹⁾ 16 (36,4)
Origine	Libanaise
Age (médiane en année)	51 [25-76]
Poids (médiane en Kg)	78 [46-125] ⁽²⁾
Taille (médiane en cm)	165 [152-183]
Clairance de la créatinine (médiane en mL/mn)	56 [44-197]
Type de chirurgie : - Orthopédiques - Abdomino-pelviennes	21 (47,7) ⁽³⁾ 23 (52,3)
Durée de l'opération (médiane en min)	155 [60-660]
Doses morphine (médianes PCA en mg) - 24 h - 48 h	44 [10-137] 65 [16-179]
Doses morphine par type de chirurgie (médianes PCA à 24 h en mg) - Orthopédiques - Abdomino-pelviennes	44 [10-137] 50 [12-88]
Scores EVA repos (moyennes) - 24 h - 48 h	1,34 [0-7] 0,67 [0-5]
Scores EVA mouvement (moyennes) - 24 h - 48 h	2,45 [0-8] 1,58 [0-6]

⁽¹⁾ (%) ⁽²⁾ [Valeurs extrêmes] ⁽³⁾ Les chiffres représentent le nombre de patients ayant subi le type de chirurgie en question et entre parenthèse le pourcentage.

Les patients sont d'origine libanaise, 64% de femmes, admis essentiellement pour des chirurgies orthopédiques et abdomino-pelviennes considérées comme des chirurgies majeures douloureuses. Ainsi les patients constituent un groupe homogène au niveau de la douleur ressentie en postopératoire.

Aucun des patients ne consommait de benzodiazépines ou d'antidépresseurs susceptibles d'altérer la perception de la douleur (co-analgésiques).

Les doses de morphine administrées par PCA étaient très variables au sein de la population : de 10 à 137 mg par 24 h et de 16 à 179 mg par 48 h (figure 14). Les doses médianes respectives étaient de 44 mg et 65 mg. Les doses médianes à 24 h n'étaient pas statistiquement différentes selon le type de chirurgie (MW, non significative -NS-). Les scores de douleurs au repos et au mouvement étaient relativement faibles à 24 et 48 h.

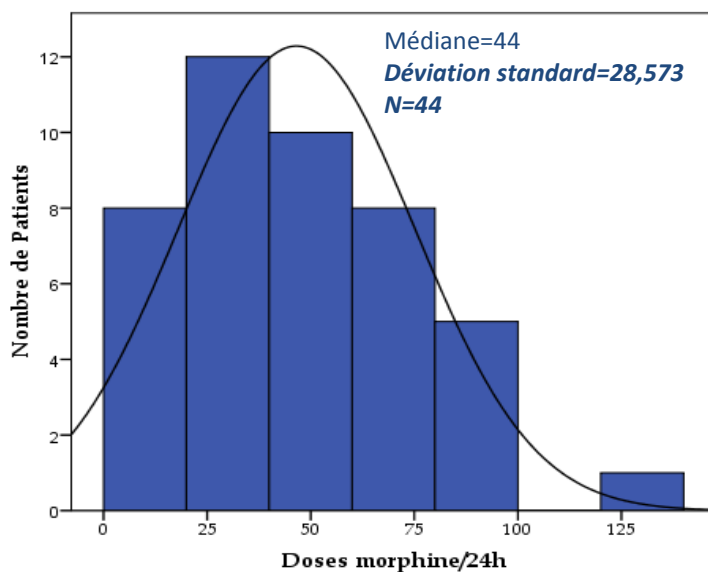


Figure 14: Variabilité des doses de morphine permettant une analgésie efficace à 24 h pour les 44 patients inclus dans notre étude (représentation en classes de doses).

Des analyses univariées entre les doses de morphine et différents facteurs cliniques et démographiques ont été conduites. Aucun des facteurs testés (âge; $p=0,085$, poids; $p=0,28$, taille; $p=0,26$, clairance de la créatinine; $p=0,8$, anxiété; $p=0,27$, durée de l'opération; $p=0,83$) n'était significativement corrélé aux doses de morphine à 24 h (corrélations de Spearman).

B- FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES

Les fréquences alléliques et génotypiques ont été calculées pour les trois SNPs étudiés (Tableau 18).

Tableau 18: Fréquences alléliques et génotypiques (%) pour les SNPs étudiés chez les patients.

	Gène	dbSNP	Allèles (A/a) ^a	Patients n=44				
				Fréquences génotypiques ^b			Fréquences alléliques	
				AA	Aa	aa	A	a
PK	<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	17 (38,6)	16 (36,4)	11 (25)	.568	.432
PD	<i>OPRM1</i>	rs1799971	A/G	34 (77,3)	10 (22,7)	0 (0)	.886	.114
	<i>COMT</i>	rs4680	Val/Met158	8 (19)	23 (54,8)	11 (26,2)	.464	.536

Abbréviations: PK: pharmacocinétique; PD: pharmacodynamie.

^a "A/a" correspondent à l'allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Le pourcentage (entre parenthèses) est précédé du nombre de patients dans chaque groupe.

C- SEQUENÇAGE DU GENE *OPRM1*

Nous avons identifié trois variants nucléotidiques autres que le polymorphisme fréquent c.118A>G (figure 15-A).

Le SNP p.Arg401X a été observé chez sept patients hétérozygotes soit environ 23% versus 18,3% dans les populations européennes -HapMap-CEU, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le variant p.Ser358Phe identifié à l'état hétérozygote chez un patient, est référencé dans les banques de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (figure 15-B et 15-C)

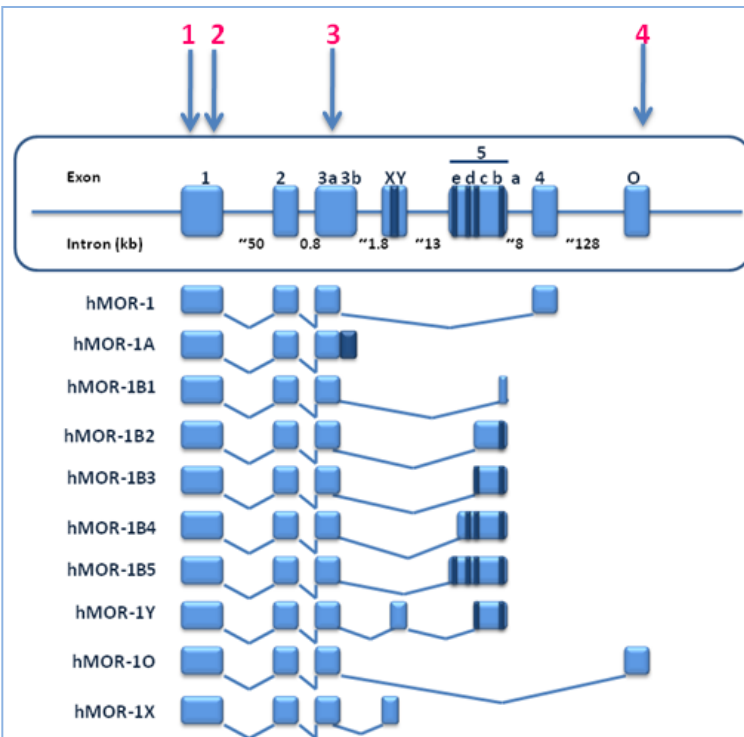


Figure 15 :

(A): Représentation schématique du gène OPRM1 et des variants d'épissage décrits chez l'homme.

(Adapté de Pan 2005)

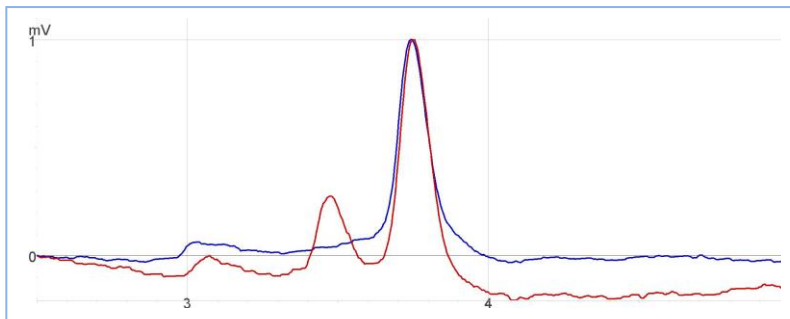
Les variants identifiés dans notre étude sont signalés par des flèches :

1- c.41C>G (p.Thr14Ser) ; exon 1

2- c.118A>G (p.Asn40Asp): rs1799971 ; exon 1

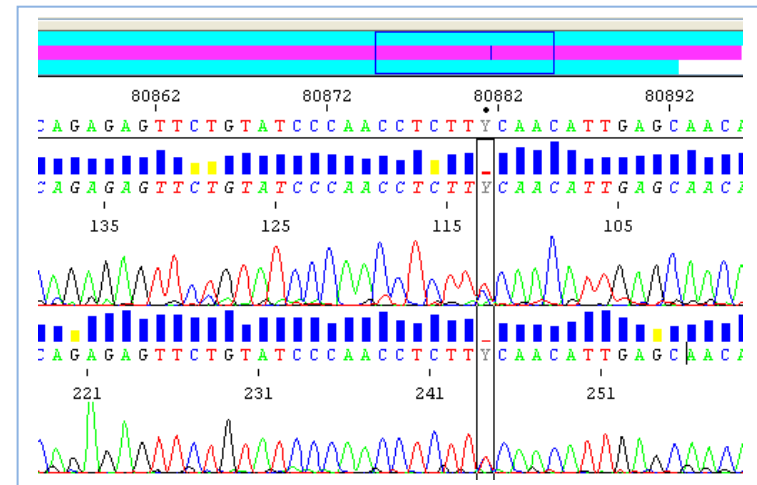
3- c.1073C>T (p.Ser358Phe): rs79216711 ; exon 3

4- c.1201C>T (p.Arg401X): rs34427887 ; exon O



(B): Profil obtenu par dHPLC pour l'exon3 d'OPRM1 pour un patient présentant le variant rs79216711 (tracé rouge) à l'état hétérozygote.

Le tracé obtenu pour un patient ne présentant pas le variant (tracé bleu) est superposé.



(C): Séquences de l'exon 3 d'OPRM1 obtenues pour le patient hétérozygote pour le variant rs79216711 (en encadré). Alignement sur Seqscape, en haut la séquence antisens, en bas la séquence sens.

Tableau 19: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les doses de morphine (mg) à 24 et 48 h.

Gène	dbSNP	Allèles (A/a) ^a	Doses morphine 24 h ^b n=44			p^d	Doses morphine 48 h ^b n=35 ^c			p^d	p_c^e
			AA	Aa	aa		AA	Aa	aa		
<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	(17) 59 [10-90]	(16) 42,5 [14- 137]	(11) 24 [10-95]	0,101	(13) 84 [22-138]	(12) 79,5 [30-179]	(10) 36,2 [16-108]	0,048	0,144
<i>OPRM1</i>	rs1799971	A/G	(34) 40 [10-137]	(10) 47 [12-95]	(0) -	0,362	(25) 76 [16-179]	(10) 72,5 [18-138]	(0) -	0,729	-
<i>COMT</i>	rs4680	Val/Met	(8) 40,5 [12-137]	(23) 40 [12-82]	(11) 100 [14-90]	0,540	(6) 54,5 [26-120]	(18) 73,5 [32-179]	(9) 79 [44-138]	0,605	-

^a“A/a” correspondent à l’allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Les chiffres correspondent, pour chaque génotype, au nombre de patients en bleu entre parenthèses puis la dose médiane [extrêmes].

^c Neuf patients ont été déperfusés avant 48 h.

^d Les valeurs de p sont obtenues par le test de KW entre les trois groupes de génotypage pour *ABCB1* et *COMT* et le test de MW pour *OPRM1*.

^e p_c correspond aux valeurs de p obtenues après correction de Holm.

E- ASSOCIATION GENOTYPES-EFFETS SECONDAIRES

Les effets secondaires rapportés sous traitement étaient la sédation et les nausées (tableaux 20 et 21).

Aucun patient n'a présenté de vomissements, vertiges/confusions, de bradycardie ou de dépression respiratoire. Les patients **homozygotes TT pour *ABCB1* c.3435C>T** ont ressenti significativement **plus de nausées** à 24 h que les patients CT ou CC (test de KW, $p < 0,009$; $p_{\text{Holm}} = 0,027$). Les autres SNPs n'étaient pas corrélés aux scores de nausées ou de sédation. Aucun des patients présentant des variants du séquençage n'avait un profil d'effets secondaires particulier.

Tableau 20: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les scores de sédation à 24 et 48 h.

Gène	dbSNP	Allèles (A/a) ^a	Sédation 24 h ^b n=44			p^d	Sédation 48 h ^b n=35 ^c			p^d
			AA	Aa	aa		AA	Aa	aa	
<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	(17) 0,058 [0-1]	(16) 0,187 [0-2]	(11) 0,09 [0-1]	0,786	(13) 84 [22-138]	(12) 79,5 [30-179]	(10) 36,2 [16-108]	0,569
<i>OPRM1</i>	rs1799971	A/G	(34) 0,117 [0-2]	(10) 0,1 [0-1]	(0) -	0,933	(25) 76 [16-179]	(10) 72,5 [18-138]	(0) -	0,496
<i>COMT</i>	rs4680	Val/Met	(8) 0,25 [0-1]	(23) 0,5 [0-2]	(11) 0,27 [0-2]	0,068	(6) 54,5 [26-120]	(18) 73,5 [32-179]	(9) 79 [44-138]	0,679

^a "A/a" correspondent à l'allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Les chiffres correspondent, pour chaque génotype, au nombre de patients en bleu entre parenthèses puis les scores moyens de sédation [extrêmes].

^c Neuf patients ont été déperfusés avant 48 h.

^d Les valeurs de p sont obtenues par le test de KW entre les trois groupes de génotypage pour *ABCB1* et *COMT* et le test de MW pour *OPRM1*.

Tableau 21: Etude d'association entre les SNPs étudiés et les scores de nausée à 24 et 48 h.

Gène	dbSNP	Allèles (A/a) ^a	Nausées 24 h ^b n=44			p^d	p_c^e	Nausées 48 h ^b n=35 ^c			p^d
			AA	Aa	aa			AA	Aa	aa	
<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	(17) 0	(16) 0	(11) 0,36 [0-2]	0,009	0,027	(13) 0	(12) 0	(10) 0,1 [0-1]	0,287
<i>OPRM1</i>	rs1799971	A/G	(34) 0,117 [0-2]	(10) 0	(0) -	0,336	-	(25) 0,04 [0-1]	(10) 0	(0) -	0,527
<i>COMT</i>	rs4680	Val/Met	(8) 0,5 [0-2]	(23) 0,04 [0-1]	(11) 0,09 [0-1]	0,688	-	(6) 0,14 [0-1]	(18) 0	(9) 0	0,105

^a "A/a" correspondent à l'allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Les chiffres correspondent, pour chaque génotype, au nombre de patients en bleu entre parenthèses puis les scores moyens de nausée [extrêmes].

^c Neuf patients ont été déperfusés avant 48 h.

^d Les valeurs de p sont obtenues par le test de KW entre les trois groupes de génotypage pour *ABCB1* et *COMT* et le test de MW pour *OPRM1*.

^e p_c correspond aux valeurs de p obtenues après correction de Holm.

I.1.4- DISCUSSION

Dans cette étude conduite chez des patients en postopératoire, les doses de morphine permettant une analgésie efficace sont apparues très variables. Les scores de douleur au repos et au mouvement étaient relativement faibles et démontraient la bonne prise en charge de la douleur chez ces patients.

De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans cette variabilité. Le récepteur opioïde μ est le site d'action primaire des opioïdes et particulièrement de la morphine. *OPRM1*, localisé au niveau du chromosome 6q24-q25, est constitué de 9 exons et code pour 19 variants d'épissage (Figure 15 ; Pasternak 2001, Shabalina 2009, Dreborg 2008). Les isoformes protéiques qui en résultent varient essentiellement au niveau de la partie intracellulaire C-terminale ; cette variabilité pourrait être à l'origine des différences d'activation de la protéine G induite suite à la fixation des agonistes opioïdes (Goodman 2011). De nombreuses études chez les rongeurs ont ainsi montré le rôle de l'épissage alternatif d'*OPRM1* dans l'analgésie (Pasternak 2001, Pasternak 2004, Schuller 1999).

De nombreux SNPs ont été décrits dans *OPRM1*, le plus connu et le plus étudié étant le SNP c.118A>G. Certains auteurs suggèrent que les variations interindividuelles de la réponse aux opioïdes peuvent être attribuées à d'autres SNPs fonctionnels d'*OPRM1* non encore décrits. Cette étude nous a permis d'identifier dans la population étudiée trois variants nucléotidiques, dont un non décrit. Parmi ces variants, il faut noter la fréquence d'un variant non-sens entraînant un raccourcissement de l'isoforme appelée hMOR-1O. Le variant hMOR-1O a été mis en évidence par une équipe américaine dans le cerveau et les auteurs ont montré que les deux sous-types de récepteurs, MOR-1 et MOR-1O, avaient des affinités similaires pour la morphine et le M6G (Pan 2003, Cadet 2004). Le rôle biologique *in vivo* du variant d'épissage MOR-1O n'a cependant pas été défini (Cadet 2004).

Concernant le variant non décrit p.Thr14Ser, la poursuite de cette étude devrait permettre d'établir sa fréquence dans les populations du moyen-orient.

Cette étude préliminaire constitue la première évaluation des fréquences génotypiques et alléliques au Liban pour les SNPs étudiés. Il existe de nombreuses communautés ethniques dans la population libanaise, la majorité (70%) étant constituée par des arabes libanais. Les fréquences alléliques dans notre étude étaient comparables à celles décrites dans les populations caucasiennes (HapMap, 118G : 0,119 versus 0,114 dans notre population ; 158Met : 0,522 versus 0,536 dans notre population) (*cf. Article : Rapid detection of p.Val158Met COMT polymorphism using fluorogenic hybridization probes*).

En ce qui concerne le SNP d'*ABCB1*, les valeurs sont plus proches de celles des asiatiques que de celles décrites pour des caucasiens (HapMap, 3435T: caucasiens (0,571) ; asiatiques (0,459) ; étude en cours (0,432); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Un réexamen comparatif des fréquences alléliques sera réalisé lorsque l'effectif des patients sera accru.

Dans l'état actuel de notre étude, les SNPs d'*OPRM1* et *COMT* étudiés ne sont associés ni aux doses de morphine postopératoire ni aux effets secondaires sous traitement.

Concernant *ABCB1*, les doses moyennes de morphine administrées aux patients TT étaient plus faibles que pour les patients CC. Cette tendance exprimée par un *p* voisin de la significativité, lissé cependant par la correction d'Holm exprimerait une tendance en accord avec les études précédemment publiées (Meineke 2002, Lötsch 2009). Le SNP c.3435C>T a été associé à une réduction de l'expression duodénale de la P-gp chez les porteurs du variant allélique T à l'état homozygote (Hoffmeyer 2000). D'un point de vue mécanistique, les patients homozygotes TT présenteraient moins d'efflux de la morphine au niveau intestinal, et peut-être également au niveau de la BHE, et nécessiteraient ainsi des doses plus faibles de morphine pour contrôler leur douleur en postopératoire.

Dans notre étude, les patients TT présentaient des nausées significativement plus importantes que les patients CT ou CC. Ces résultats sont en accord avec ceux de Coulbault et al. (Coulbault 2006) qui avaient montré que l'allèle C était protecteur vis-à-vis des nausées et vomissements chez 74 patients en postopératoire. Une étude récente, réalisée sur un total de 1579 patients cancéreux (recrutement au niveau de 17 centres de 11 pays européens), n'a cependant pas trouvé de corrélation entre *ABCB1* et les effets secondaires nauséeux chez les patients (tous opioïdes confondus) (Laugsand 2011).

Au final, ce moindre besoin de morphine des patients TT pour atteindre un degré d'antalgie équivalent, tout en présentant une moins bonne tolérance concernant les effets nauséux de la morphine, appelle une confirmation sur une plus large population.

I.1.5- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a permis une première estimation des fréquences alléliques de différents SNPs des gènes *OPRM1*, *ABCB1* et *COMT* dans la population libanaise. Par ailleurs, un variant d'*OPRM1* non décrit à ce jour et trois variants déjà répertoriés ont été identifiés. Il serait intéressant d'explorer les conséquences de ces SNPs sur l'épissage alternatif et sur la fonction du récepteur μ .

Le gène *ABCB1* a été associé à la survenue des nausées. Si ces résultats se confirment sur une cohorte plus importante, il pourrait être envisageable de génotyper les patients afin d'optimiser leur prise en charge.

En effet, dans le système de santé libanais, le coût de la PCA est pris en charge par le patient lui-même (de 100 à 200 euros environ selon les classes payantes contre 10 euros en moyenne pour un génotypage). Selon les anesthésistes associés au projet, l'intérêt d'associer un génotype à un besoin réduit en morphine (patients TT) permettraient de faire bénéficier les patients correspondants d'une simple analgésie locorégionale accompagnée d'antalgiques par voie orale avant les chirurgies douloureuses. Il serait aussi envisageable chez ces patients de prévenir les nausées par l'administration d'anti-nauséux. Les patients CC quant à eux, seraient candidats à la PCA pour contrôler eux-mêmes les doses de morphine nécessaires pour une analgésie efficace et pourraient bénéficier également de l'analgésie « balancée » ou « multimodale » telle qu'elle a été proposée par l'équipe de Kehlet (Kehlet 1993). Le concept d'analgésie balancée suggère qu'une association de produits analgésiques (par voie locale périphérique ou systémique : AINS, kétamine, corticostéroïdes, etc.) permettrait d'améliorer l'analgésie et diminuer les effets secondaires.

I.2- PHARMACOGENETIQUE DES OPIACES CHEZ LES PATIENTS OBESES

I.2.1- RATIONNEL DE L'ETUDE ET OBJECTIFS

L'obésité est une maladie chronique définie par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30. Près de 1,5 milliards de personnes à travers le monde sont obèses et la prévalence de cette affection est croissante (OMS 2010). La prévalence de l'obésité morbide (IMC>40) a doublé en France entre 2000 et 2006 (0,4% à 0,8%).

Les sujets obèses présentent des douleurs articulaires invalidantes, liées à leur surpoids important, et les empêchent d'avoir une activité physique qui contribuerait à leur amaigrissement. L'absence de prise en charge optimale de la douleur après prescription d'antalgiques de palier II est principalement liée à une méconnaissance des facteurs déterminant la variabilité de réponse aux morphiniques dans cette population particulière où le rapport efficacité/toxicité respiratoire est vraisemblablement non superposable à celle de l'adulte non obèse. La crainte de la survenue d'effets indésirables est probablement justifiée, dans une population où la prévalence du syndrome d'apnées du sommeil et de l'hypoventilation alvéolaire est élevée (Lloret Linares 2009).

L'objectif principal de cette étude était d'établir les valeurs des fréquences alléliques et génotypiques de variants de trois gènes (*OPRM1*, *ABCB1*, *COMT*) dans une population de patients caucasiens présentant une obésité morbide. Ces trois gènes sont impliqués dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la morphine et pourraient moduler la réponse à la morphine de ces patients.

Ma contribution à cette étude a été d'extraire les ADN, de génotyper les patients, d'établir les fréquences alléliques, de participer à leur analyse ainsi qu'à la rédaction de l'article suivant :

Lloret Linares C, **Hajj A**, Poitou C, Simoneau G, Clement K, Laplanche JL, Lépine JP, Bergmann JF, Mouly S, Peoc'h K, **Pilot study examining the frequency of several gene polymorphisms involved in morphine pharmacodynamics and pharmacokinetics in a morbidly obese population**, *Obes Surg.* 2011 Aug;21(8):1257-64).

I.2.2- PATIENTS ET METHODES

109 patients (dont 94 caucasiens, 74,5% femmes, âge moyen 37,1 ans) présentant une obésité morbide ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) admis dans le service de nutrition du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière (Paris) entre Juillet 2007 et Janvier 2009 ont été inclus dans cette étude. L'ADN a été extrait à partir du sang total (leucocytes circulants) recueilli sur EDTA avec le kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) selon les recommandations du fabricant.

Les patients ont été génotypés pour les SNPs *OPRM1* c.118A>G (rs1799971), *COMT* p.Val158Met (ou c.472G>A; rs4680) et *ABCB1* c.3435C>T (rs1045642) par une technique de PCR en temps réel (Applied Biosystems) selon la méthode décrite **paragraphe II.3.3- Matériels et Méthodes**.

Les fréquences génotypiques et alléliques des patients ont été comparées à celles des populations contrôles caucasiennes de la littérature. Les résultats des génotypages ont ensuite été corrélés aux données cliniques.

I.2.3- PRINCIPAUX RESULTATS

Cette étude a permis d'établir les fréquences génotypiques et alléliques chez des patients présentant un IMC moyen de $49,2 \text{ kg/m}^2$ (Intervalle: 40-76 ; 74,5% de femmes). Les fréquences alléliques observées pour les patients caucasiens étaient, pour *OPRM1* 118G : 0,23 ; *ABCB1* 3435C : 0,5 ; et *COMT* 158Met : 0,47. Ces fréquences ne différaient pas selon le sexe. L'IMC n'a été associé ni au sexe ni aux génotypes.

La fréquence de l'allèle 118G d'*OPRM1* était significativement plus élevée ($p < 0,01$) dans la population de sujets obèses que nous avons étudiée que dans la majorité des populations européennes publiées dans les bases de données et dans la littérature (de 0,07 à 0,153).

I.2.4- DISCUSSION: *OPRM1* ET CIRCUIT DE RECOMPENSE

Dans notre étude, l'allèle G du SNP c.118A>G d'*OPRM1* était significativement plus fréquent dans la population de patients obèses caucasiens (n=94) que dans les différentes populations contrôles publiées.

Le système opioïde joue un rôle important dans le processus de récompense. De nombreuses études ont évalué le rôle d'*OPRM1* dans la dépendance aux substances notamment à l'alcool et l'héroïne (Bart 2005, Filbey 2008, van den Wildenberg 2007) mais également dans la régulation de la prise alimentaire (Davis 2009). Une revue a montré qu'une activation des récepteurs opioïdes, renforce les sensations de plaisir ressenties lors de la consommation des aliments sucrés et gras (Olszewski 2007). Une étude plus récente a étudié la prévalence de différents polymorphismes de *DRD2* et d'*OPRM1* dans une population de sujets obèses. Les auteurs ont ainsi montré que l'allèle 118G d'*OPRM1* était plus fréquent chez les patients présentant des troubles du comportement alimentaire (0,18) (*Binge eating disorder* ou BED) par rapport au groupe contrôle (patients obèses sans BED, Davis 2009). Notre observation est en accord avec cette étude ; la fréquence allélique de 118G de 0,22 étant même légèrement supérieure à celle observée par Davis et al. pour le groupe avec BED.

Ainsi, selon l'hypothèse de Davis et al., les patients homozygotes pour l'allèle G auraient tendance à avoir une prise de poids plus importante après une restriction alimentaire sévère, telle que celle rapportée chez les patients souffrant d'obésité morbide.

I.2.5- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, j'ai identifié un allèle d'*OPRM1*, 118G sur-représenté chez des patients présentant une obésité morbide. La conséquence de cette observation, si elle est confirmée, serait que les patients obèses présenteraient un effet analgésique moindre à la morphine, sans protection contre la survenue de dépression respiratoire (*cf paragraphe IV.2.3-Variabilité et pharmacodynamie des opioïdes*), un aspect qui devrait rendre l'utilisation de la morphine encore plus prudente dans un contexte de forte prévalence d'insuffisance respiratoire. Des études complémentaires telles que la mesure du seuil de la douleur chez l'obèse vont être mis en œuvre afin d'explorer les conséquences cliniques et pharmacodynamiques de cette observation, située dans un domaine frontière entre la physiopathologie et la pharmacogénétique.

Ces travaux soulignent l'importance de la personnalisation des traitements en particulier dans des groupes de patients ciblés dont les caractéristiques physiologiques ou physiopathologiques s'écartent de celles de la population générale, tels que les patients obèses, les personnes âgées ou les enfants.

Pilot Study Examining the Frequency of Several Gene Polymorphisms Involved in Morphine Pharmacodynamics and Pharmacokinetics in a Morbidly Obese Population

Célia Lloret Linares · Aline Hajj · Christine Poitou · Guy Simoneau ·
Karine Clement · Jean Louis Laplanche · Jean-Pierre Lépine ·
Jean François Bergmann · Stéphane Mouly · Katell Peoc'h

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Morbidly obese patients are at significantly elevated risk of postsurgery complications and merit closer monitoring by health care professionals after bariatric surgery. It is now recognized that genetic factors influence individual patient's response to drug used in anesthesia and analgesia. Among the many drug administered by anes-

tists, we focused in this pilot study on morphine, since morphine patient-controlled anesthesia in obese patients undergoing gastric bypass surgery is frequently prescribed. We examined the allelic frequency of three polymorphisms involved in morphine pharmacodynamics and pharmacokinetics in patients with body mass index (BMI) >40. One hundred and nine morbidly obese patients (BMI=49.1±7.7 kg/m²) were genotyped for three polymorphisms c. A118G of mu opioid receptor (*OPRM1*), c.C3435T of the P-glycoprotein gene (*ABCB1*), and p.Val158Met of catechol-O-methyltransferase gene (*COMT*). Allelic frequencies were 118G—0.22, C3435—0.55, and 158Met—0.5 in our whole population and 0.23, 0.5, and 0.47 in Caucasian population. Allelic frequencies did not differ according to gender. Mean BMI did no differ according to the allelic variant. *OPRM1*118G allele was more frequent in our population than in most previously described European populations. Since the concept of “personalized medicine” promises to individualize therapeutics and optimize medical treatment in term of efficacy and safety, especially when prescribing drugs with a narrow therapeutic index such as morphine, further clinical studies examining the clinical consequences of the *OPRM1* c.A118G polymorphism in patients undergoing gastric bypass surgery are needed.

C. Lloret Linares · C. Poitou · K. Clement
Department of Nutrition and Endocrinology,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital,
Paris 75013, France

C. Lloret Linares · G. Simoneau · J. F. Bergmann · S. Mouly
Department of Internal Medicine,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière,
Unit of Therapeutic Research,
75475 Paris Cedex 10, France

A. Hajj · J. L. Laplanche · J.-P. Lépine · S. Mouly · K. Peoc'h
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U705,
Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7157,
Faculty of Pharmacy, Paris-Cité Descartes University,
Paris 75006, France

A. Hajj · J. L. Laplanche · K. Peoc'h
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière,
75475 Paris Cedex 10, France

C. Poitou · K. Clement
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
U872 team7, Nutrimique, Cordelier Research Center,
Paris 75006, France

K. Peoc'h (✉)
Hôpital Lariboisière,
Service de Biochimie et Biologie Moléculaire,
2 rue Ambroise Paré,
75010 Paris, France
e-mail: katell.peoch@lrh.ap-hop-paris.fr

Keywords Morphine · Pharmacogenetics · Obesity ·
OPRM1 · *ABCB1* · *COMT* · Analgesia

List of abbreviations

<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, subfamily B, member 1
BMI	body mass index
COMT	catechol-O-methyltransferase (enzyme and gene)
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

M6G	morphine-6-glucuronide
MAO-A	monoamine oxydase A
MAO-B	monoamine oxydase B
MOR	mu opioid receptor
<i>OPRM1</i>	mu opioid receptor gene
P-gp	P-glycoprotein
SNP	single nucleotide polymorphism

Introduction

Bariatric surgery is increasingly used to obtain substantial weight loss and to reduce obesity-related comorbidities. Concerns about the safety of bariatric surgery have grown along with its increasing popularity [1, 2]. Morbidly obese subjects, with or without obstructive sleep apnea, experience frequent oxygen desaturation episodes postoperatively despite supplemental oxygen therapy suggesting that perioperative management strategies in morbidly obese patients undergoing laparoscopic bariatric surgery should include measures to prevent postoperative hypoxemia [3].

The concept of “personalized medicine” promises to individualize therapeutics and optimize medical treatment in terms of efficacy and safety, especially when prescribing drugs displaying narrow therapeutic index such as morphine [4]. Morphine has been widely used within the fields of anesthesia and acute chronic pain for many years, and its use is characterized by large interpatient variations in dose requirements and by occurrence of side effects [5, 6]. A better understanding of opioid response’s variability could help to identify the adequate balance between pain control and the avoidance of sedative or respiratory depressant side effects; moreover, it will improve clinical management of these patients. The following genes have been reported to affect either the pharmacokinetics or the pharmacodynamics of morphine: *OPRM1*, *ABCB1*, and *COMT* encoding for the mu opioid receptor (MOR), the drug transporter P-glycoprotein (P-gp), and the catechol-O-methyltransferase (COMT), respectively.

MOR is the primary target of opioid drugs. Genetic polymorphisms resulting in changes in receptor density and function may partially explain interpatient variations in opioid response [4]. Genotype distribution and allelic frequencies of the *OPRM1* c.A118G single nucleotide polymorphism (SNP) varies between ethnic groups [7–10]. This polymorphism is associated with lower MOR and mRNA levels in human autopsy brain tissues due to a transcription defect [11]. In healthy subjects, G allele is associated with decreased efficacy of morphine and morphine-6-glucuronide (M6G), the need for two to four times higher concentrations of alfentanil to control pain and with 10–12 times higher concentrations to obtain the same respiratory depression than in wild-type patients [12, 13].

The occurrence of adverse events such as nausea and vomiting following M6G administration is lower among subjects carrying the 118G allele [12, 14]. Although 118G allele carriers are less sensitive to mechanical pain, this allele is associated with lower analgesia and higher morphine requirement to achieve pain relief [9, 15–18]. Interestingly, this polymorphism may predict clinical response to naltrexone in alcohol-dependent individuals, suggesting greater sensitivity to morphine antagonist in G carriers patients [19–25].

Drug transporters facilitate the passage of opioid drugs across biological membranes in liver, kidney, intestine, and at the blood brain barrier. Systems involved in both efflux and uptake of drugs can potentially influence absorption, distribution, and elimination of opioids. Genetic polymorphism in these transporters may therefore account for some of the interpatient variability in response to opioid drugs. Morphine is a well-known substrate of the drug efflux pump P-gp (encoded by *ABCB1*) that modulates its oral bioavailability, elimination, and brain-to-blood efflux [26–28]. Interindividual variability in P-gp expression and activity is important and may be partly explained by the c.C3435T SNP [29–34]. Indeed, this SNP has been previously associated with variations in morphine cerebrospinal fluid concentrations, suggesting its role in morphine efficacy and tolerance [35]. Campa et al. reported that pain relief variability was significantly associated with both *ABCB1* c.C3435T and *OPRM1* c.A118G polymorphisms in Italian patients [36]. Recent studies also suggested that the effect of the c.C3435T polymorphism was reinforced by the association with other polymorphisms within the same gene [17, 37].

The COMT metabolizes catecholamines and several studies suggested some links between dopaminergic and adrenergic systems and the pain signal transmission [38]. A common polymorphism in *COMT*, p.Val158Met (present in about 50% of Europeans [39, 40]) causes a valine (Val) to methionine (Met) substitution at codon 158 in the COMT enzyme, leading to a three- to fourfold reduced activity. Therefore, this SNP may explain part of the interindividual difference in the adaptation and response to pain and may be involved in morphine dosing requirements and side effects [38, 41, 42]. The homozygous carriers of the variant allele may require significantly lower doses of morphine to achieve pain relief as compared to wild type subjects [27, 42]. Reyes-Gibby et al. studied the influence of *COMT* p.Val158Met and *OPRM1* c.A118G on dose requirements to achieve cancer pain relief: Homozygous patients with *OPRM1* AA and *COMT* Met/Met genotypes required the lowest morphine dose (87 mg/24 h) compared to wild type patients (147 mg/24 h) [42].

In the present study, we aimed to study genes implied in opioid pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with body mass index (BMI) over 40 kg/m² candidate for bariatric surgery. We examined three SNPs in three genes

coding for mu opioid receptor (*OPRM1*), P-glycoprotein (*ABCB1*), and *COMT*.

Patients and Methods

Subjects and Anthropometric Data

This study enrolled 109 morbidly obese subjects, candidate for bariatric surgery with BMI ≥ 40 kg/m², and consecutively admitted to the Department of Nutrition at La Pitié Salpêtrière Hospital (Paris, France) between July 2007 and January 2009. Written informed consent for the genetic study was obtained from all patients and the local Research Ethics Board approved the study protocol.

Body weight was measured to the nearest 0.1 kg with subjects in indoor clothing and no shoes. Height was measured to the nearest 0.5 cm with a wall-mounted stadiometer, in the same conditions. BMI was calculated as weight (kg) divided by height squared (m²).

Ethnicity was a data available for most of the patients. In only three cases, ethnic descents were not reported in the patient medical file.

Genetic Analysis

DNA was extracted from EDTA whole blood samples using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). The samples were genotyped for the following SNPs: *OPRM1* (c.A118G; rs1799971), *COMT* (c.G472A p.Val158Met; rs4680), and *ABCB1* (c.C3435T; rs1045642). Genotyping was performed using Real Time PCR Taqman assays (StepOne plus, Applied Biosystems, Foster City, USA) following the manufacturer's instructions. Water control, previously genotyped samples, and genomic DNA were included in each experiment to ensure the accuracy of genotyping.

Control Populations

We searched for recent studies focusing on the allelic frequency of *OPRM1* c.A118G, *ABCB1* c.C3435T, and *COMT* p.Val158Met in control Caucasian population [7, 40, 43]. We screened Caucasian populations and selected in the corresponding articles the data necessary to compare allelic frequencies between control Caucasian populations and our morbidly obese Caucasian population.

Statistical Analysis

Statistical analysis was implemented in Statview v4.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Quantitative data were presented as mean \pm standard deviation. Comparisons between genotypes were performed by means of Fisher's PLSD

Table 1 Patients characteristics according to genotype (mean \pm SD)

Population	<i>OPRM1</i> c.A118G (rs1799971)				<i>ABCB1</i> c.C3435T (rs1045642)				<i>COMT</i> p.Val158Met (c.G472A, rs4680)				<i>p</i>
	AA <i>n</i> =66	AG <i>n</i> =38	GG <i>n</i> =5		CC <i>n</i> =34	CT <i>n</i> =51	TT <i>n</i> =24		Val/Val <i>n</i> =29	Val/Met <i>n</i> =51	Met/Met <i>n</i> =29		
Genotypic frequency (%)	60.5	34.9	4.6		31.2	46.8	22		26.6	46.8	26.6		
Caucasians (<i>n</i>)	55	34	5		23	48	23		21	46	27		
Age (years)	37.1 (11.1)	37.8 (11.3)	39.5 (12.6)		39.6 (12.2)	37.6 (11.4)	36.2 (9.1)		35.0 (11.8)	37.9 (10.5)	37.8 (11.6)		ns
Height (m)	1.67 (0.1)	1.65 (0.1)	1.70 (0.1)		1.69 (0.1)	1.67 (0.1)	1.66 (0.1)		1.68 (0.1)	1.66 (0.1)	1.68 (0.1)		ns
Weight (kg)	138.6 (27.1)	132.4 (24.4)	151 (35.1)		134.6 (25.9)	141.0 (30.1)	139 (21.9)		138.5 (21.6)	137 (29.7)	141.5 (27.9)		ns
BMI (kg/m ²)	49.2 (7.7)	48.1 (7.4)	52.1 (12.9)		46.7 (5.9)*	50.3 (8.4)*	50.1 (8.1)		48.7 (6.1)	49.1 (8.1)	49.7 (8.7)		* <i>p</i> =0.359

BMI body mass index (weight in kilograms divided by height squared in meters), ns no statistically significant difference

Table 2 Allelic frequencies in the whole population including Caucasian and non-Caucasian patients

Gene	Polymorphisms	Allele	Allelic frequency (%)
<i>OPRM1</i>	c.A118G (rs1799971)	A	0.78
		G	0.22
<i>ABCB1</i>	c.C3435T (rs1045642)	C	0.55
		T	0.45
<i>COMT</i>	p.Val158Met (rs4680)	Val	0.5
		Met	0.5

test. Khi-2 test was performed to compare allelic frequencies. A *p* value of 0.05 or less was considered significant.

Results

Patients' characteristics are summarized in Table 1. Overall, 82 of the 110 subjects studied were women (74.5%). Mean age of the population was 37.1 ± 11.1 years and the mean BMI was 49.2 kg/m^2 (range: 40.1–76), with no significant differences neither between genders nor genotypes. Allelic frequencies in the whole population including Caucasian and non-Caucasian patients are presented in Table 2. Genotypes distribution according to ethnic groups and gender for the different polymorphisms are summarized in Table 3. Allelic frequencies were *OPRM1* 118G—0.22, *ABCB1* C3435—0.55, and *COMT* 158Met—0.5 in our whole population and 0.23, 0.5, and 0.47 in Caucasian population. These frequencies did not differ according to gender. Mean BMI did not differ according to the allelic variant. *OPRM1* 118G allele was more frequent in our patients population than in most previously described

European populations. Comparisons between allelic frequencies in our obese Caucasian population and Caucasian populations are reported in Table 4. No significant differences with the Hardy–Weinberg expected values were observed.

Discussion

Variability in morphine's pharmacodynamics and/or pharmacokinetics may have clinical consequences since morbid obesity is frequently associated with respiratory diseases [3, 6]. The molecular basis of this variability is not well defined. To the best of our knowledge, this is the first study describing three distinct SNPs involved in morphine variability in a population of morbidly obese patients.

The *OPRM1* 118G frequency in our Caucasian subgroup (0.234) is significantly higher than most of the previously reported frequencies (6/8 studies) [7, 25, 44–50]. *OPRM1* may have implications in the vulnerability to develop obesity, however this hypothesis remains debated. The reward system may modulate motivated and consummatory behavior and SNPs altering dopamine and serotonin availability have been involved in human obesity [51–53]. *OPRM1* was also involved in many drug abuses and in obesity [21, 54, 55]. Davis et al. examined *OPRM1* genotypes distribution in obese individuals in relation to different patterns of overeating [56]. The obese patients with binge eating had a greater frequency of the “gain of function” G allele of the *OPRM1* SNP (allele G=0.18; mean BMI=35.6 kg/m^2) as compared to obese controls (allele G=0.10; mean BMI=39.2 kg/m^2). The authors hypothesized that the tendency to binge eat would be magnified in G allele carriers, responsible for an increased responsiveness to opiates and alcohol, and their higher risk for addiction to these substances. The G allele is more

Table 3 Genotype distribution according to ethnic group and gender

Genotype	Ethnic group				Gender	
	Caucasian <i>n</i> =94	African <i>n</i> =10	Asian <i>n</i> =2	NA <i>n</i> =3	Female <i>n</i> =82	Male <i>n</i> =28
<i>OPRM1</i> c.A118G (rs1799971)						
AA	55	10	0	1	48	18
AG	34	0	2	2	29	9
GG	5	0	0	0	5	1
<i>ABCB1</i> c.C3435T (rs1045642)						
CC	23	8	1	2	23	11
CT	48	1	1	1	40	12
TT	23	1	0	0	19	5
<i>COMT</i> p.Val158Met (c.G472A, rs4680)						
Val/Val	21	6	2	0	23	6
Val/Met	46	3	0	2	37	14
Met/Met	27	1	0	1	22	8

NA data not available

Table 4 Comparisons of allelic frequency of the mutant allele between our Caucasian population and previously published control populations

Population	Reference	<i>n</i>	Allelic frequency	χ^2	<i>p</i>
<i>OPRM1</i> c.A118G (rs1799971)			118G		
Our study (obese Caucasian population)		94	0.234		
European American	Bergen et al. [44]	80	0.125	28.91429	ns
European American	Bond et al. [45]	52	0.114	116.3319	<0.01
European American	Crowley et al. [25]	100	0.153	9.676474	ns
European American	Luo et al. [47]	179	0.137	88.58994	<0.01
European American	Schinka et al. [48]	297	0.136	282.3692	<0.01
German	Franke et al. [49]	365	0.121	408.2335	<0.01
Swedish	Bart et al. [50]	170	0.074	106.8096	<0.01
Finnish	Bergen et al. [44]	184	0.111	102.7786	<0.01
<i>ABCB1</i> c.C3435T (rs1045642)			3435T		
Our study (obese Caucasian population)		94	0.500		
European American	Komoto et al. [60]	99	0.430	4.073695	ns
European Netherlands	Aardnouse et al. [61]	89	0.490	0.641254	ns
European UK	Roberts et al. [62]	190	0.480	97.15958	<0.01
Turkish European	Bebek et al. [63]	174	0.510	73.60386	<0.01
German	Fiedler et al. [64]	1,005	0.470	1,651.648	<0.01
German	Cascorbi et al. [65]	461	0.460	584.581	<0.01
German	Hoffmeyer et al. [29]	188	0.520	94.15064	<0.01
<i>COMT</i> p.Val158Met (c.G472A, rs4680)			158Met		
Our study (obese Caucasian population)		94	0.532		
European American	Strous et al. [70]	87	0.464	4.893594	ns
European American	Egan et al. [71]	55	0.454	63.17802	<0.01
European UK	Daniels et al. [46]	78	0.53	6.567438	ns
European UK	Karayiorgou et al. [72]	129	0.488	20.04963	ns
European UK	Norton et al. [73]	334	0.542	344.9319	<0.01
Canadian European	Joober et al. [74]	96	0.500	0.833333	ns
French European	De Chaldee et al. [75]	137	0.533	26.99331	ns
Turkish European	Herken et al. [76]	65	0.577	28.14116	ns
German	Gallinat et al. [77]	170	0.556	68.19721	<0.01
German	Rujescu et al. [78]	323	0.500	324.935	<0.01
Finnish	Illi et al. [79]	94	0.521	0.089748	ns

ns no statistically significant difference

frequent in our population than in previously reported populations of obese patients even in the population suffering from binge eating (allele G=0.10; mean BMI=39.2 kg/m²) [56]. Based on the hypothesis of Davis et al., the G allele may lead to a tendency to weight regain in patients after severe food restriction, as frequently reported in the history of morbid obese patients candidate to bariatric surgery [56]. Interestingly, supporting this hypothesis, Raymond et al. reported a decrease in pain perception in obese patients only in the case of eating disorders [57].

Xu et al. recently reported, in a Chinese Uyghur population with a mean BMI of 26.5±4.39 (18.5–43.1), that subjects carrying the G allele had a 25% reduced risk of getting obese than those carrying the common A allele, suggesting this allele might prevent obesity due to a possibly less active MOR [58]. However, the G allele is two- to fourfold more present in

patients of Asian descents than in Caucasians [7]. Moreover, many environmental factors, which may differ between Caucasians and Asians, are necessary to the development of obesity and could be implied in this apparent discrepancy.

Regarding the *ABCB1* c.C3435T, none of the alleles is significantly overrepresented in our population as compared to controls [29, 43, 59–65]. Some studies yet reported a relationship between this polymorphism and obesity or weight gain. The *ABCB1* (c.G2677T and c.C3435T) polymorphisms have been associated to risperidone-induced weight gain in 108 schizophrenic women [66]. Among 5,448 Japanese individuals, the c.G2677T polymorphism was also significantly associated with obesity ($p=0.0003$), but these results have not yet been confirmed in Caucasians; moreover, molecular basis of such an association may need further investigation [67]. Our study does not

highlight any association between *ABCB1* c.C3435T and obesity in a population without neuroleptics.

Dopamine is involved in motivation and reward circuits and is a potent neuromodulator of ventral striatum reactivity, widely implicated in reward processing [51, 53, 68]. It has been suggested that dopamine deficiency in obese individuals may perpetuate pathological eating as a means to compensate the decreased activation of these circuits [68]. Dopamine availability is largely controlled by two enzymes: the COMT and the monoamines oxidase (MAO-A and MAO-B) and by the dopamine transporter [69]. These genes have well-characterized functional variants but only *COMT* polymorphisms have been implicated, until now, in nociception and morphine pharmacodynamics [40, 42].

Neither the Val nor the Met alleles of the p.Val158Met SNP was overrepresented in our patients as compared to controls [46, 70–79].

Several phenotypes of obesity (metabolic consequences in men, loss of fat mass after exercise intervention in menopausal women) have been associated to this polymorphism, which is involved in estrogen and androgen metabolism [80, 81]. However, without distinction of the phenotypes of obesity, the *COMT* p.Val158Met polymorphism may play the same role in morphine pharmacodynamics as in the general population.

In conclusion, in this population of morbid obese patients candidate to bariatric surgery, the *OPRM1* 118G allele was more frequent as compared to previously published controls. This pilot study identifies a candidate gene to explore the interindividual variability in morphine response and requirements in morbidly obese population. Further clinical investigations focusing on this allele are needed to identify its consequences in the clinical setting. Further clinical studies are also needed to explore the role of this SNP in morphine pharmacodynamics in patients undergoing gastric bypass in order to individualize morphine prescription and optimize the concept of “personalized medicine” in this population at risk of postsurgery complications.

Conflict of interest None.

References

1. Flum DR, Belle SH, King WC, et al. Perioperative safety in the longitudinal assessment of bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2009;361:445–54.
2. Flum DR, Salem L, Elrod JA, et al. Early mortality among Medicare beneficiaries undergoing bariatric surgical procedures. *Jama*. 2005;294:1903–8.
3. Ahmad S, Nagle A, McCarthy RJ, et al. Postoperative hypoxemia in morbidly obese patients with and without obstructive sleep apnea undergoing laparoscopic bariatric surgery. *Anesth Analg*. 2008;107:138–43.
4. Somogyi AA, Barratt DT, Collier JK. Pharmacogenetics of opioids. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81:429–44.
5. Aubrun F, Bunge D, Langeron O, et al. Postoperative morphine consumption in the elderly patient. *Anesthesiology*. 2003;99:160–5.
6. Lloret Linares C, Decleves X, Oppert JM, et al. Pharmacology of morphine in obese patients: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48:635–51.
7. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2006;83:262–8.
8. Grosch S, Niederberger E, Lotsch J, et al. A rapid screening method for a single nucleotide polymorphism (SNP) in the human MOR gene. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52:711–4.
9. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, et al. The 118 A>G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48:1232–9.
10. Ikeda K, Ide S, Han W, et al. How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:311–7.
11. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, et al. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (*OPRM1*) caused by variant A118G. *J Biol Chem*. 2005;280:32618–24.
12. Lotsch J, Skarke C, Grosch S, et al. The polymorphism A118G of the human mu-opioid receptor gene decreases the pupil constrictory effect of morphine-6-glucuronide but not that of morphine. *Pharmacogenetics*. 2002;12:3–9.
13. Oertel BG, Schmidt R, Schneider A, et al. The mu-opioid receptor gene polymorphism 118A>G depletes alfentanil-induced analgesia and protects against respiratory depression in homozygous carriers. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:625–36.
14. Romberg RR, Olofsen E, Bijl H, et al. Polymorphism of mu-opioid receptor gene (*OPRM1*:c.118A>G) does not protect against opioid-induced respiratory depression despite reduced analgesic response. *Anesthesiology*. 2005;102:522–30.
15. Chou WY, Wang CH, Liu PH, et al. Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy. *Anesthesiology*. 2006;105:334–7.
16. Chou WY, Yang LC, Lu HF, et al. Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50:787–92.
17. Coulbault L, Beaussier M, Verstuyft C, et al. Environmental and genetic factors associated with morphine response in the postoperative period. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79:316–24.
18. Hirota T, Ieiri I, Takane H, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:677–80.
19. Kim RB. MDR1 single nucleotide polymorphisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences. *Pharmacogenetics*. 2002;12:425–7.
20. Ray LA, Hutchison KE. Effects of naltrexone on alcohol sensitivity and genetic moderators of medication response: a double-blind placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64:1069–77.
21. Ray R, Jepson C, Patterson F, et al. Association of *OPRM1* A118G variant with the relative reinforcing value of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;188:355–63.
22. Filbey FM, Ray L, Smolen A, et al. Differential neural response to alcohol priming and alcohol taste cues is associated with DRD4 VNTR and *OPRM1* genotypes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32:1113–23.
23. Wiers RW, Rinck M, Dictus M, et al. Relatively strong automatic appetitive action-tendencies in male carriers of the *OPRM1* G-allele. *Genes Brain Behav*. 2009;8:101–6.

24. Kim SG, Kim CM, Choi SW, et al. A micro opioid receptor gene polymorphism (A118G) and naltrexone treatment response in adherent Korean alcohol-dependent patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;201:611–8.
25. Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, et al. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence. *Psychiatr Genet*. 2003;13:169–73.
26. Drewe J, Ball HA, Beglinger C, et al. Effect of P-glycoprotein modulation on the clinical pharmacokinetics and adverse effects of morphine. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50:237–46.
27. Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, et al. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;74:543–54.
28. Skarke C, Darimont J, Schmidt H, et al. Analgesic effects of morphine and morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:107–21.
29. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3473–8.
30. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology*. 2006;44:62–74.
31. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, et al. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72:572–83.
32. Song P, Lamba JK, Zhang L, et al. G2677T and C3435T genotype and haplotype are associated with hepatic ABCB1 (MDR1) expression. *J Clin Pharmacol*. 2006;46:373–9.
33. Owen A, Goldring C, Morgan P, et al. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:365–70.
34. Thorn M, Finnstrom N, Lundgren S, et al. Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60:54–60.
35. Meineke I, Freudenthaler S, Hofmann U, et al. Pharmacokinetic modelling of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of neurosurgical patients after short-term infusion of morphine. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54:592–603.
36. Campa D, Gioia A, Tomei A, et al. Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:559–66.
37. Collier JK, Barratt DT, Dahlen K, et al. ABCB1 genetic variability and methadone dosage requirements in opioid-dependent individuals. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:682–90.
38. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*. 2003;299:1240–3.
39. Ross JR, Rutter D, Welsh K, et al. Clinical response to morphine in cancer patients and genetic variation in candidate genes. *Pharmacogenomics J*. 2005;5:324–36.
40. Fan JB, Zhang CS, Gu NF, et al. Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2005;57:139–44.
41. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 1995;34:4202–10.
42. Reyes-Gibby CC, Shete S, Ravvag T, et al. Exploring joint effects of genes and the clinical efficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene. *Pain*. 2007;130:25–30.
43. Scheiner MA, Damasceno AM, Maia RC. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Mol Biol Rep*. 2010;37:111–8.
44. Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. 1997;2:490–4.
45. Bond C, LaForge KS, Tian M, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9608–13.
46. Daniels JK, Williams NM, Williams J, et al. No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high or low catechol O-methyltransferase activity. *Am J Psychiatry*. 1996;153:268–70.
47. Luo X, Kranzler HR, Zhao H, et al. Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;120B:97–108.
48. Schinka JA, Town T, Abdullah L, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*. 2002;7:224–8.
49. Franke P, Wang T, Nothen MM, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet*. 2001;105:114–9.
50. Bart G, Heilig M, LaForge KS, et al. Substantial attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with heroin addiction in central Sweden. *Mol Psychiatry*. 2004;9:547–9.
51. Need AC, Ahmadi KR, Spector TD, et al. Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability. *Ann Hum Genet*. 2006;70:293–303.
52. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, et al. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363:3191–200.
53. Fuemmeler BF, Agurs-Collins TD, McClellon FJ, et al. Genes implicated in serotonergic and dopaminergic functioning predict BMI categories. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16:348–55.
54. Gosnell BA, Levine AS. Reward systems and food intake: role of opioids. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33 Suppl 2:S54–8.
55. Olszewski PK, Levine AS. Central opioids and consumption of sweet tastants: when reward outweighs homeostasis. *Physiol Behav*. 2007;91:506–12.
56. Davis CA, Levitan RD, Reid C, et al. Dopamine for "Wanting" and Opioids for "Liking": a comparison of obese adults with and without binge eating. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:1220–5.
57. Raymond NC, de Zwaan M, Faris PL, et al. Pain thresholds in obese binge-eating disorder subjects. *Biol Psychiatry*. 1995;37:202–4.
58. Xu L, Zhang F, Zhang DD, et al. OPRM1 gene is associated with BMI in Uyghur population. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:121–5.
59. Bournissen FG, Moretti ME, Juurlink DN, et al. Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: a meta-analysis. *Epilepsia*. 2009;50:898–903.
60. Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, et al. MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21:126–32.
61. Aarnoudse AL, van Schaik RH, Dieleman J, et al. MDR1 gene polymorphisms are associated with neuropsychiatric adverse effects of mefloquine. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:367–74.
62. Roberts RL, Joyce PR, Mulder RT, et al. A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline-induced postural hypotension in patients treated for major depression. *Pharmacogenomics J*. 2002;2:191–6.

63. Bebek N, Cine N, Oner GO, et al. Genotype and allele frequencies of MDR-1 C3435T polymorphism in Turkish population. *J Neurol Sci* (Turkish). 2005;37:261–6.
64. Fiedler T, Buning C, Reuter W, et al. Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63:917–25.
65. Cascorbi I, Gerloff T, John A, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:169–74.
66. Kuzman MR, Medved V, Bozina N, et al. The influence of 5-HT (2C) and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients. *Psychiatry Res*. 2008;160:308–15.
67. Ichihara S, Yamada Y, Kato K, et al. Association of a polymorphism of ABCB1 with obesity in Japanese individuals. *Genomics*. 2008;91:512–6.
68. Dreher JC, Kohn P, Kolachana B, et al. Variation in dopamine genes influences responsivity of the human reward system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:617–22.
69. Forbes EE, Brown SM, Kimak M, et al. Genetic variation in components of dopamine neurotransmission impacts ventral striatal reactivity associated with impulsivity. *Mol Psychiatry*. 2009;14:60–70.
70. Strous RD, Bark N, Woerner M, et al. Lack of association of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1997;41:493–5.
71. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6917–22.
72. Karayiorgou M, Gogos JA, Galke BL, et al. Identification of sequence variants and analysis of the role of the catechol-O-methyl-transferase gene in schizophrenia susceptibility. *Biol Psychiatry*. 1998;43:425–31.
73. Norton N, Kirov G, Zammit S, et al. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *Am J Med Genet*. 2002;114:491–6.
74. Joob R, Gauthier J, Lal S, et al. Catechol-O-methyltransferase Val-108/158-Met gene variants associated with performance on the Wisconsin Card Sorting Test. *Arch Gen Psychiatry*. 2002;59:662–3.
75. de Chazotte M, Laurent C, Thibaut F, et al. Linkage disequilibrium on the COMT gene in French schizophrenics and controls. *Am J Med Genet*. 1999;88:452–7.
76. Herken H, Erdal ME. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association between symptomatology and prognosis. *Psychiatr Genet*. 2001;11:105–9.
77. Gallinat J, Bajbouj M, Sander T, et al. Association of the G1947A COMT (Val(108/158)Met) gene polymorphism with prefrontal P300 during information processing. *Biol Psychiatry*. 2003;54:40–8.
78. Rujescu D, Giegling I, Gietl A, et al. A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol Psychiatry*. 2003;54:34–9.
79. Illi A, Kampman O, Anttila S, et al. Interaction between angiotensin-converting enzyme and catechol-O-methyltransferase genotypes in schizophrenics with poor response to conventional neuroleptics. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003;13:147–51.
80. Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, et al. Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism*. 2008;57:708–11.
81. Tworoger SS, Chubak J, Aiello EJ, et al. The effect of CYP19 and COMT polymorphisms on exercise-induced fat loss in postmenopausal women. *Obes Res*. 2004;12:972–81.

II- VARIABILITE DE LA REPONSE A LA METHADONE

II.1- INTRODUCTION

Il existe une grande variabilité interindividuelle de la réponse à la méthadone, de la dose nécessaire pour obtenir l'équilibre thérapeutique ainsi que des effets secondaires sous traitement. La compréhension de cette variabilité devrait se faire en tenant compte de l'ensemble des données cliniques, contextuelles (co-prescriptions de médicaments, comorbidités) et génétiques.

L'étude que j'ai entreprise visant à mettre en évidence des facteurs de variabilité de la réponse à la méthadone s'est inscrite dans le cadre d'un protocole de recherche clinique financé conjointement par la DRC et la Mission Interministérielle de Lutte contre les Drogues et la Toxicomanie (MILDT, Paris), appelé «METHADOSE» (France).

II.2- PHARMACOGENETIQUE DE LA REPONSE A LA METHADONE

II.2.1-RATIONNEL DE L'ETUDE

Trente à 80% des patients recevant de la méthadone sont considérés comme de « mauvais répondeurs », c'est-à-dire n'arrêtant pas la consommation de substances addictives, notamment les opiacés (Fonseca 2011).

Des doses très élevées (supérieures à 200 mg/j) sont fréquemment prescrites aux Etats-Unis, et exceptionnelles en France où la moyenne se situe entre 60 et 100 mg/j (Vazquez 2006, Kreek 2010). L'instauration d'un traitement par la méthadone se fait de façon progressive du fait du risque de décès par intoxication aigue ou *overdose* (dépression respiratoire de surdosage) en début de traitement. A l'issue de cette période, le prescripteur procède avec le patient à une série d'essai-erreurs pour déterminer la dose optimale, pouvant durer plusieurs mois pendant lesquels les patients présentent soit des symptômes de manque, soit des signes de surdosage, soit une consommation persistante d'opiacés illicites. L'adaptation progressive par paliers selon la réponse clinique permet, à partir d'une posologie maximale, jugée efficace («*dose maximale*»), de diminuer progressivement les doses afin de réduire la consommation d'opiacés de substitution jusqu'à l'obtention d'une dose optimisée, dite «*dose actuelle*» ; l'objectif final étant d'arrêter le traitement. La variabilité des doses de méthadone peut se trouver théoriquement accentuée par la stéréosélectivité de la liaison aux protéines plasmatiques et son métabolisme (Foster 2000).

II.2.2-OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de ce travail a été d'identifier si des facteurs cliniques et génétiques de la variabilité de réponse thérapeutique à la méthadone pouvaient être identifiés chez des patients substitués au long court par la méthadone.

a. Dans le cadre de ce travail, nous avons exploré des gènes susceptibles de moduler la **pharmacocinétique** et la **pharmacodynamie** de la méthadone :

- i. le transport de la méthadone *via* la P-gp ;
- ii. son métabolisme, notamment médié par les CYP3A4 et CYP2D6;

iii. sa cible, ou certains circuits de récompense au niveau central ; en effet, des variations d'activité des enzymes du métabolisme ou de l'affinité des récepteurs dopaminergiques pourraient diminuer la stimulation naturelle du circuit de récompense, et ainsi influencer la réponse au traitement.

Différents traits phénotypiques ont été étudiés :

- La **réponse au traitement** objectivée par des critères cliniques et toxicologiques ;
- Les **doses maximales de méthadone**, permettant d'atteindre l'équilibre thérapeutique ;
- Les **doses actuelles de méthadone**, ajustées en fonction de la réponse du patient ;
- Les **méthadonémies résiduelles**, correspondant aux concentrations de méthadone présentes dans le plasma juste avant la prise suivante, rapportées à la dose.

b. **Des gènes** impliqués dans la susceptibilité à un **effet secondaire cardiaque** dose-dépendant connu de la méthadone : **l'allongement de l'espace QT** sur l'électrocardiogramme. Nous avons recherché s'il existait une vulnérabilité génétique pouvant prédisposer certains patients au risque majeur de Tdp sous ce traitement.

Ce deuxième volet s'articule avec le premier, car des doses élevées de méthadone, parfois nécessaires pour équilibrer le traitement, sont un facteur de risque d'allongement du QT.

La réalisation de ce travail expérimental m'a amenée à établir les génotypes des patients inclus dans le projet METHADOSE pour les gènes candidats présentés, depuis l'extraction de l'ADN obtenu dans différentes conditions de recueil (prélèvement sanguin comparé au frottis buccal), la mise au point des génotypages (PCR en temps réel et détermination du nombre de copies de gène) jusqu'à l'analyse des résultats, confrontés aux données cliniques et biologiques (test au midazolam oral, concentrations plasmatiques de méthadone, statut viral).

Secondairement, à la suite d'une analyse des ADN de patients sur puces à ADN, j'ai exploité les fichiers de génotypage fournis en utilisant un logiciel dédié, ce qui m'a permis d'éclairer la relation entre méthadone, allongement du QT et gènes des canaux cardiaques.

Enfin, j'ai documenté une interaction méthadone-duloxétine observée en clinique en utilisant un modèle cellulaire d'interaction au niveau de la P-gp.

II.2.3- MATERIELS ET METHODES

a- Patients

METHADOSE est une étude transversale multicentrique portant sur l'étude des facteurs de variabilité phénotypique et génotypique associés à la dose orale de méthadone chez des patients répondeurs au traitement dépendants à l'héroïne dans la perspective d'établir un modèle prédictif de la dose de méthadone afin d'optimiser la prise en charge des patients toxicomanes. Ce projet a obtenu les autorisations requises auprès de l'AFSSAPS (Projet OST, Optimisation des stratégies thérapeutiques¹) et a été approuvé par le comité d'éthique (CPP Ile-de-France VI).

Un consentement écrit a été obtenu de tous les patients. La majorité des inclusions et le recueil des données cliniques ont été réalisés dans le service de Psychiatrie du Pr Lépine (Groupe hospitalier Lariboisière - Fernand Widal- Paris).

Les critères d'inclusion et de non inclusion étaient les suivants :

- CRITERES D'INCLUSION
 - Patient, Homme ou Femme, dont l'âge est ≥ 18 ans
 - Patient affilié à un régime de Sécurité Sociale
 - Patient ayant signé un consentement libre et éclairé.
- CRITERES DE NON INCLUSION
 - Toute personne spécialement protégée : par exemple : majeurs protégés par la loi, personnes hospitalisées sans leur consentement, à la demande d'un tiers ou d'office, personnes privées de liberté par une décision judiciaire, malades en situation d'urgence.

Les patients sont considérés comme **répondeurs** à la méthadone quand ils satisfont à tous les critères suivants de façon continue pendant les trois derniers mois : doses stables, absence d'overdose, de signe clinique de surdosage ou de sevrage, absence d'injection IV, absence de consommation d'opiacés illicites (déclaration personnelle confirmée par un prélèvement

¹ Numéro d'enregistrement EudraCT : 2007-007662-37, numéro AFSSAPS: A80286-43, numéro clinicaltrials : NCT00894452

toxicologique urinaire de contrôle), absence des critères de dépendance à la cocaïne, à l'alcool et aux benzodiazépines, absence de séroconversion dans les trois mois VIH/VHC et suivi thérapeutique régulier. Les critères de dépendance et d'abus ont été définis suivant la classification de la DSM-IV. Les patients **non répondeurs** poursuivent la consommation de l'héroïne ou d'autres stupéfiants en complément de la méthadone et/ou n'ont pas une réponse suffisante pour stabiliser leur dose de traitement.

L'étude était réalisée en deux étapes:

1- Visite d'inclusion²:

Au cours de cette visite, un examen clinique, un recueil de données cliniques concernant la dépendance aux opiacés, un ECG, une recherche urinaire de drogues illicites, un test de grossesse pour les femmes ont été réalisés. Au terme de cette visite, les patients étaient classés en répondeurs/ non répondeurs au traitement. Les patients non répondeurs ont été prélevés pour analyse génétique (5 mL de sang prélevé sur EDTA) mais n'ont pas été convoqués pour poursuivre l'étude. A l'inclusion, les patients ont reçu un numéro d'anonymat.

2- Visite en hôpital du Jour³ -HDJ- Seuls les patients répondeurs ont été convoqués pour une demi-journée à l'HDJ au cours de laquelle ont été réalisés :

- le test fonctionnel au midazolam mesurant l'activité du CYP3A4 (phénotypage du CYP3A4)
- le dosage plasmatique de (R)- et (S)-méthadone ainsi que le recueil de l'heure de prise et le schéma d'administration
- le prélèvement sanguin pour les sérologies virales (VIH, VHC et VHB)
- le prélèvement sanguin pour les analyses génétiques
- une recherche urinaire de drogues illicites.

Le diagramme suivant résume les effectifs des patients relatifs à chaque analyse.

² Centre Murger, hôpital Fernand Widal, Pr Lépine.

³ Unité de Recherches Thérapeutiques, Hôpital Lariboisière, Pr Bergmann, sous la responsabilité du Pr Mouly.

et kits Promega) suivant les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm (NanoDrop ND1000[®], Wilmington, Etats-Unis). La qualité de l'ADN a été évaluée par le rapport 260/280 correspondant au rapport ADN/impuretés. Il devait être compris entre 1,8 et 2.

La réalisation du projet s'est heurtée à la difficulté d'obtention d'échantillons sanguins chez certains patients, en raison notamment d'un capital veineux altéré. De plus, le recrutement des patients se faisant au niveau de nombreux sites parisiens, il était souhaitable de mettre au point une technique de prélèvement facilement praticable par le clinicien. Une étude de collecte des cellules buccales afin d'extraire l'ADN chez les patients toxicomanes a donc été entreprise. Il était nécessaire d'évaluer préalablement ce mode de prélèvement chez les toxicomanes qui présentent souvent une sécheresse buccale (xérostomie) ainsi que des lésions au niveau de la muqueuse dues au traitement par la méthadone, au manque d'hygiène bucco-dentaire, à la malnutrition et aux infections associées.

La technique que nous avons testé (Papiers FTA, Whatman International[®]) constitue une alternative efficace au prélèvement sanguin chez ces patients puisque la quantité et la qualité d'ADN obtenues étaient satisfaisantes, et 100% des échantillons ont pu être génotypés par différentes techniques de génotypages (PCR suivie de dHPLC, PCR en temps réel, ou séquençage). De plus, les patients et les cliniciens ont apprécié la simplicité et le caractère peu invasif du prélèvement (Hajj et al. 2010, **Annexe 4**).

c- Génotypages

i. PCR en temps réel

Les génotypages par PCR en temps réel sur l'ADN génomique ont été réalisés à l'aide des kits de génotypage TaqMan[®] *SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) suivant les recommandations du fabricant. Le Tableau 22 détaille les SNPs étudiés. Les génotypages ont été réalisés sur un instrument StepOne plus (Applied biosystems).

a- Protocole opératoire

Brièvement, 5 µL de mélange réactionnel (Genotyping Master Mix) sont ajoutés à 0,25 µL du mélange amorces et sondes du SNP étudié (Genotyping assay 40 X) et d'eau distillée (qsp 10

μL). Neuf μL de ce mélange réactionnel est déposé dans chaque puit d'une microplaque. Une dilution de l'ADN est réalisée en fonction de sa concentration de départ afin d'obtenir une concentration finale de 10 ng/μL (10 ng). 1 μL de cette solution finale est déposé dans chaque puit selon le plan défini au préalable (Logiciel StepOne 2.0). Les plaques sont scellées, centrifugées puis déposées sur un Step One plus (Applied Biosystems) pour permettre la réaction de PCR en temps réel.

b- Lecture et interprétation des résultats

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel StepOne qui permet de les visualiser (par intégration du signal de fluorescence des différents fluorochromes associés aux sondes) sous forme de trois nuages de points correspondant aux trois génotypes (Figure 18).

Figure 18: Représentation graphique des résultats de génotypage du SNP c.3435C>T d'ABCB1 après analyse par le logiciel StepOne

Les points bleus correspondent aux homozygotes CC, les points verts aux hétérozygotes CT et les points rouges correspondent aux homozygotes TT.

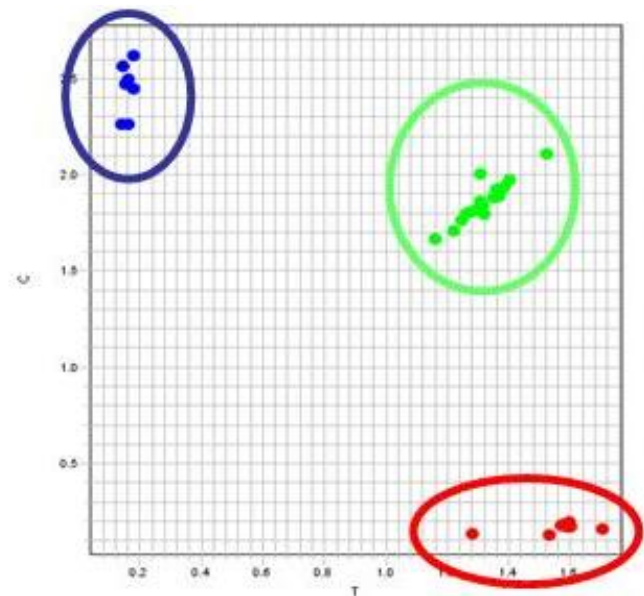


Tableau 22: Liste des SNPs étudiés par PCR en temps réel dans le cadre de ce projet

	Rs	Gène	SNP	Conséquence fonctionnelle	Localisation
PK	rs1045642	<i>ABCB1</i>	c.3435C>T	Synonyme	Exon 26
PD	rs1799971	<i>OPRM1</i>	c.118A>G	p.Asn40Asp	Exon 1
Cascade Dopaminergique	rs1611115	<i>DBH</i>	g.4031T>C	Transcription Modifiée*	Promoteur
	rs1800497	<i>DRD2</i> (TaqI A)	g.17316G(C)>A(T)	p.Glu713Lys	Exon 8
	rs6277	<i>DRD2</i>	c.957C>T	Synonyme	Exon 7
	rs4680	<i>COMT</i>	c.472G>A	p.Val158Met*	Exon 6

*Activité enzymatique modifiée

ii. Détermination du nombre de copies de gène

Nous avons mis au point la méthode de détermination du nombre de copie des gènes **CYP3A4** et **CYP2D6** par PCR en temps réel sur l'ADN génomique, en utilisant un kit Applied Biosystems, avec une normalisation par le gène de la RNase P.

a- Principe

La quantification était fondée sur la méthode des C_T comparatifs, qui comprend deux étapes :

- 1- Etape de quantification absolue par rapport à une droite d'étalonnage (préparation de la multiplex en rajoutant du Master Mix -*gene copy number*- des amorces et des sondes CYP2D6 ou CYP3A4 (marquées par le fluorochrome FAM) et des amorces et sondes RNaseP (marquées par le fluorochrome VIC) et de cinq concentrations (0,625 -1,25 - 2,5 -5 -10 ng/μl) d'ADN passées en triplet). La droite de régression obtenue est optimisée en fonction d'un certain nombre de critères de qualité :

- ▶ C_T sd (*Standart Deviation*) <0,2
- ▶ $20 < C_T < 30$: PCR efficace
- ▶ $3,7 < \text{Pente} < 3,6$: efficacité à 90-110%
- ▶ $E(\text{RNase P}) - E(\text{CYP2D6}) < 10\%$
- ▶ Sachant que $E = 10^{(1/\text{pente})} - 1$
- ▶ $R^2 > 0,98$ (coefficient de la droite de régression)

- 2- Etape de quantification relative (en présence de contrôles négatifs et d'ADN contrôles – nombre de copies égal à 2) et comparaison des ΔC_T . Le nombre de copies (A) du gène d'intérêt (en l'occurrence **CYP2D6** ou **CYP3A4**) étant déterminé par la formule suivante :

$$A = 2^{(-\Delta C_T)}$$

Sachant que $\Delta C_T = [(C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ contrôle interne}) \text{ échantillon A}]$

- $[(C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ contrôle interne}) \text{ échantillon B}]$

b- Protocole opératoire

Brièvement, 12,5 µL de mélange réactionnel (Master Mix) sont ajoutés à 1,25 µL du mélange amorces et sondes *CYP2D6* ou *CYP3A4*, 1,25 µL du mélange amorces et sondes RNase P et 5 µL d'eau distillée. 20 µL de ce mélange réactionnel sont déposés dans chaque puit. Une dilution de l'ADN est réalisée en fonction de sa concentration de départ afin d'obtenir une concentration finale de 2,5 ng/µL (12,5 ng). 5 µL de cette solution finale sont ensuite déposés dans chaque puit. La détermination des C_T pour chaque patient et ceux de la droite d'étalonnage pour les points à 12,5 ng permettent de déterminer le nombre de copies du gène d'intérêt.

iii. Génotypage par micro-arrays

Certains génotypages ont été réalisés à l'aide des puces à ADN (ou *microarrays*, Illumina), obtenues dans le cadre d'un projet INSERM collaboratif multi-équipes coordonné par l'UMR S775 (Pr Laurent-Puig; UFR Biomédicales - Paris Descartes), auquel était associée l'unité dans laquelle j'ai effectué ma thèse. Elles ont été utilisées afin de génotyper des patients du projet METHADOSE (répondeurs et non répondeurs) pour environ 18000 variants nucléotidiques (SNPs) de 1395 gènes regroupés en cinq catégories en fonction des grandes classes fonctionnelles d'intérêt. Les hybridations ont été réalisées par la société Integragen (Evry, France) sur la base des ADN fournis selon des concentrations et un format précis. Les résultats des génotypages nous ont été transmis sous forme de deux fichiers contenant environ 1 500 000 génotypes. Le premier fichier (« MAP ») contenait la liste des SNP étudiés (identifiés par leur dénomination de référence ou « rs ») et le second fichier (« PED ») contenait, pour chaque patient étudié, l'ensemble des génotypes pour les 18000 SNP, les allèles étant par convention notés 1 ou 2.

Ces fichiers ont été analysés à l'aide d'un logiciel « maison » dédié (*PharCra*, Cyril Bourdaillet, UMR S775) qui permet d'extraire les données gène par gène.

Pour chaque SNP retenu dans l'étude, les allèles associés aux chiffres 1 et 2 ont été identifiés grâce au fichier MAP et l'allèle dominant grâce à la référence du SNP par consultation de la banque de données.

Tableau 23 : SNPs du CYP3A4, CYP3A5 et POR géotypes par microarrays.

	CYP3A4	CYP3A5	POR
1	rs2404955	rs41279854	rs12537282
2	rs12333983	rs28365083	rs1966363
3	rs4986913	rs10264272	rs239953
4	rs4986910	rs4646450	rs4728533
5	rs1041988	rs41279857	rs6949454
6	rs45614732	rs776746	rs7804806
7	rs2242480	rs28383468	rs7796654
8	rs28371759		rs10954724
9	rs3208363		rs4732513
10	rs4646437		rs10954732
11	rs2246709		rs4732516
12	rs4987161		rs1057870
13	rs12721627		
14	rs4986908		
15	rs4986907		
16	rs3091339		
17	rs12721634		
18	rs2740574		

Les résultats ont été ensuite inclus dans un tableau excel (Numéros d'anonymat des patients, SNPs recherchés et géotypes correspondants).

Parmi les gènes étudiés par cette approche, nous avons choisi d'exploiter 18 SNPs du *CYP3A4*, 7 de *CYP3A5* et 12 de *POR* (tableau 23). D'autres gènes ont également été explorés dans l'exploration pharmacogénétique des effets secondaires cardiaque de la méthadone (*cf. II.4- Evaluation des facteurs génétiques impliqués dans les effets secondaires cardiaques de la méthadone*).

d- Test au midazolam oral

Les patients répondeurs et ne présentant pas de contre indications (n=68, figure 17) ont reçu 2 mg de midazolam oral⁴. Des prélèvements sanguins ont été réalisés à 30 min et 4 h. Le dosage du midazolam (CAS Number : 59467-70-8, Sigma, France) et de ses métabolites 1- et 4-OH midazolam (CAS Number : 59468-90-5 et 59468-85-8 respectivement, Sigma, France) a été réalisé par LC-MS (Thermo Fisher, Allemagne)⁵. Les ratios 1+4OH midazolam/midazolam

⁴ Unité de recherche thérapeutique, Hôpital Lariboisière, Paris, Pr Mouly (Inserm U705 ; UMR 8206).

⁵ Service de Pharmacologie, Hôpital Saint Louis, Paris, Dr Houzé.

(RM) ont été calculés à 30 min et 4 h. Les limites de quantification étaient de 3,13 ng/mL pour le midazolam, 0,31 ng/mL pour le 1-OH midazolam et 0,16 ng/mL pour le 4-OH midazolam.

e- Dosage de la méthadone

La concentration plasmatique résiduelle de méthadone a été obtenue chez 59 patients répondeurs (figure 17) ; la méthadone a été dosée par LC-MS (Chromatographie liquide-spectrophotométrie de masse -TSQ Quantum Ultra, Fisher-)⁶. La séparation des énantiomères (R)-et (S)- de la méthadone a été réalisée sur le même appareil en utilisant une phase stationnaire chirale Chiralcel® JO-RH (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) avec une colonne de garde (10 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Daicel Chemical Industries, Tokyo, Japon).

f- Analyse statistique

Les tests non paramétriques de KW et de MW ont été utilisés pour les comparaisons entre sous-groupes en utilisant le logiciel StatEl (version 2.5). Les différences statistiques entre les différentes fréquences génotypiques et alléliques ainsi que les écarts à la loi de Hardy-Weinberg ont été déterminés par le test du χ^2 ou le test exact de Fisher. Une valeur de $p \leq 0,05$ est considérée comme statistiquement significative. La correction de Holm a été appliquée pour les comparaisons multiples, les valeurs de p avec et sans correction ont été présentées lorsque cela était informatif.

Les modèles de régression linéaire univariée et multivariée ont été réalisés sur le logiciel R-software (version 2.11.1).

Les données cliniques et biologiques (doses maximales et actuelles et méthadonémies) sont présentées par la médiane et les valeurs aux 25^{ème} et 75^{ème} percentiles, indiquées entre crochets.

⁶ Service de Pharmacie-Pharmacologie-Toxicologie, Hôtel Dieu, Paris, Dr Labat-Deveaux (Inserm U705 ; UMR 8206).

II.2.4- RESULTATS

A- CARACTERISTIQUES DES PATIENTS

A ce jour, 111 patients traités par la méthadone ont été inclus dans le protocole. Quatre vingt-un sont répondeurs (équilibrés) et trente patients non répondeurs (figure 17).

Les patients sont majoritairement des hommes, d'origine caucasienne, 59% environ sont séropositifs pour le VHC et 12% pour le VIH. Le tableau 24 rassemble les principales caractéristiques cliniques et démographiques des patients.

Les patients non répondeurs sont significativement plus jeunes (MW, $p < 0,00001$), et ont commencé plus précocement la prise de méthadone (MW, $p < 0,0014$).

Parmi les patients, une majorité présente des antécédents de dépendance au cannabis, et les patients non répondeurs présentent plus fréquemment des antécédents de dépendance à l'alcool.

Tableau 24: Données démographiques et cliniques des patients.

	PATIENTS REPONDEURS n=81 (73%)	PATIENTS NON REPONDEURS n=30 (27%)
Nombre de patient : Hommes Femmes	59 (72,8) ⁽¹⁾ 22 (27,2)	23 (76,7) 7 (23,3)
Age Moyen	44 [23-65] ⁽²⁾	36 [23-49]
Nombre de patients Caucasiens	73	25
<u>Statut sérologique :</u> VIH VHC	10 (12,3) 48 (59,2)	2 (6,7) 9 (30)
1ère prescription de méthadone (en années)	35 [18-50]	31 [21-41]
Dose actuelle de méthadone (Médiane : mg/jour)	55 [7-320]	55 [15-150]
Dose maximale de méthadone (Médiane : mg/jour)	80 [20-320]	80 [20-160]
Méthadonémie (ng/mL)	121 [3,7-388,4]	Non disponible

Age de 1ère consommation d'opiacés	20 [11-32]	21 [15-33]
Antécédents de dépendance :		
Alcool	41/81 (50)	20/30 (66,7)
THC	60/81 (73,2)	24/30 (80)
Cocaïne	55/81 (67)	21/30 (70)
ECG		
Allongement intervalle QTc (22%)	414 ms [350-575 ms] 11/64 (17,2)	420 ms [367-512 ms] 7/20 (35)

⁽¹⁾(%) ⁽²⁾[Valeurs extrêmes]

Au moment de l'inclusion, la dose médiane de méthadone était de 55 mg/j pour tous les patients alors que la dose médiane maximale était de 80 mg/j. Les doses permettant d'atteindre l'équilibre thérapeutique sont très variables (de 7 à 320 mg/j) au sein de la population des patients répondeurs, les doses actuelles des patients non répondeurs sont moins variables (de 15 à 150 mg/j) (figure 19). Les doses maximales et actuelles ne sont pas statistiquement différentes entre les groupes.

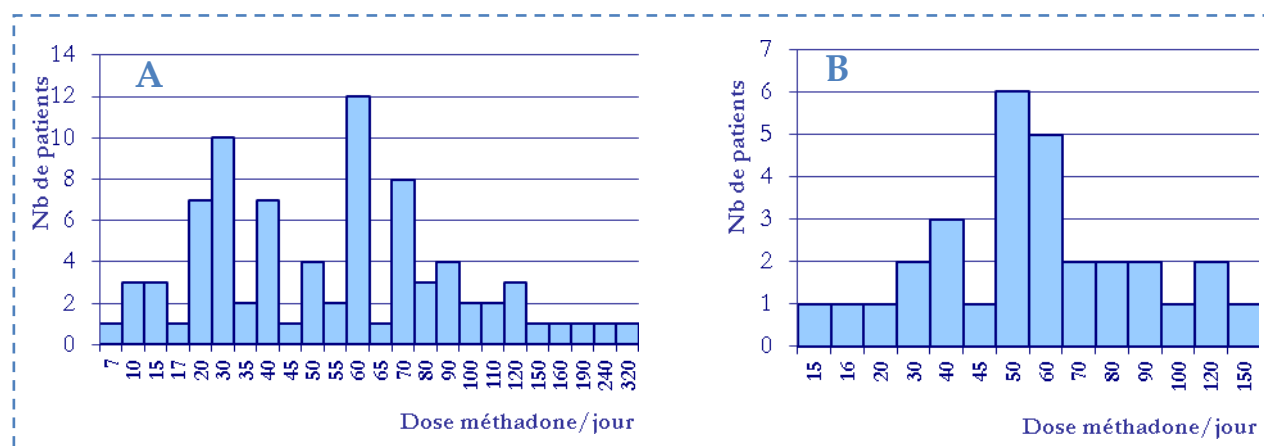


Figure 19: Variabilité des doses de méthadone à l'équilibre thérapeutique chez les patients répondeurs (A) et celle des patients non répondeurs (B) inclus dans notre étude.

B- FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES : ASSOCIATION A LA REPONSE AU TRAITEMENT

Au total, 98 patients caucasiens répondeurs et non répondeurs ont été inclus dans l'analyse génétique. Les patients non caucasiens ont été exclus de l'analyse des résultats génétiques afin

d'éviter les biais statistiques dus aux différences interethniques. La distribution des génotypes ne s'écarte pas de la loi de Hardy-Weinberg. Les fréquences alléliques et génotypiques des SNPs ont été comparées entre les groupes des patients répondeurs (n=73) et non répondeurs (n=25) (Tableau 25). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes.

Tableau 25 : Fréquences alléliques et génotypiques (%) pour les SNPs étudiés chez les patients répondeurs et non répondeurs.

	Gène	dbSNP	Allèles	Patients répondeurs					Patients non répondeurs					p
			(A/a) ^a	n=73 (74,5 %)					n=25 (25,5 %)					
				Fréquences génotypiques ^b			Fréquences alléliques		Fréquences génotypiques ^b			Fréquences alléliques		
				AA	Aa	aa	A	a	AA	Aa	aa	A	a	
PK	ABCB1	rs1045642	C/T	20 (27,4)	42 (57,5)	11 (15,1)	.562	.438	12 (48)	10 (40)	3 (12)	.680	.320	0,14
	POR ^c	rs7804806	G/A	28 (53,8)	21 (40,4)	3 (5,8)	.740	.260	-	-	-	-	-	-
PD	OPRM1	rs1799971	A/G	50 (68,5)	20 (27,4)	3 (4,1)	.822	.178	16 (64)	8 (32)	1 (4)	.800	.200	0,72
CIRCUITS DE RECOMPENSE	DRD2	rs6277	T/C	24 (32,9)	29 (39,7)	20 (27,4)	.527	.473	6 (24)	9 (36)	10 (40)	.420	.580	0,18
	DRD2 (TaqIA)	rs1800497	G/A	52 (71,2)	16 (21,9)	5 (6,8)	.822	.178	15 (60)	7 (28)	3 (12)	.740	.260	0,21
	DBH	rs1611115	C/T	46 (63)	23 (31,5)	4 (5,5)	.788	.212	17 (68)	7 (28)	1 (4)	.820	.180	0,6
	COMT	rs4680	Val/Met	25 (34,2)	33 (45,2)	15 (20,5)	.568	.432	10 (40)	8 (32)	7 (28)	.560	.440	0,9

^a « A/a » correspondent à l'allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Le pourcentage (entre parenthèses) est précédé du nombre de patients dans chaque groupe.

^c Les fréquences alléliques pour *POR* ont été déterminées, chez 52 patients équilibrés, pour le SNP significativement corrélé aux valeurs des RM du test au midazolam oral.

C- ASSOCIATION GENOTYPE-PHENOTYPE :

TEST AU MIDAZOLAM ORAL

Soixante huit patients répondeurs ayant eu un test au midazolam oral (52 hommes, 16 femmes, âge moyen: 44 ans) ont été étudiés. Pour ce sous-groupe de patients, les doses médianes maximales et à l'équilibre de méthadone étaient respectivement de 80 mg/j [intervalle : 35-320] et 60 mg/j [intervalle : 7-320].

Les RM à 30 min et 4 h étaient très variables au sein de la population (valeurs médianes: 0,8 [0-7,43] et 1,34 [0-7,31]). Ils n'étaient corrélés ni à la dose actuelle (figure 20), ni à la dose maximale de méthadone, ni aux concentrations plasmatiques résiduelles rapportées aux doses (Test de Spearman, NS)

► *Influence de l'infection par VHC et VIH*

Soixante deux pour cent des patients étaient infectés par le VHC, sans corrélation avec les résultats des tests au midazolam (MW, NS).

Treize pour cent (9/68) des patients étaient infectés par le VIH. Ils étaient tous sous traitement anti-rétroviral. Les patients infectés par le VIH (n=9, RM=1,502) avaient des RM significativement plus élevés à 4h que les patients VIH- (n=59, RM=0,133), avec une activité métabolique du CYP3A 11,3 fois plus importante (production d'une quantité plus importante des métabolites hydroxylés en position 1 et 4) (MW : $p<0,0074$) (Figure 21-B).

► *Influence de la consommation de benzodiazépine*

Quarante patients (59%) avaient des traitements associés à leur prise de méthadone et 28 (41%) consommaient particulièrement des benzodiazépines. L'activité du CYP3A n'était pas corrélée à la prise concomitante d'autres médicaments (MW, NS), à l'exclusion des **benzodiazépines** (BZD). En effet, les RM à 30 min et à 4 h étaient significativement différents entre les groupes de patients consommateurs et non consommateurs de BZD (MW : $p<0,017$ et $p<0,05$ respectivement) le groupe consommateur ayant une activité du CYP3A plus importante (figure 21-A). Ainsi par exemple, le RM moyen à 30 min du groupe BZD+ (n=40) était **presque**

doublé par rapport à celui du groupe BZD- (n=28, RM=1,055 et RM=0,570 ; test MW, $p<0,017$).

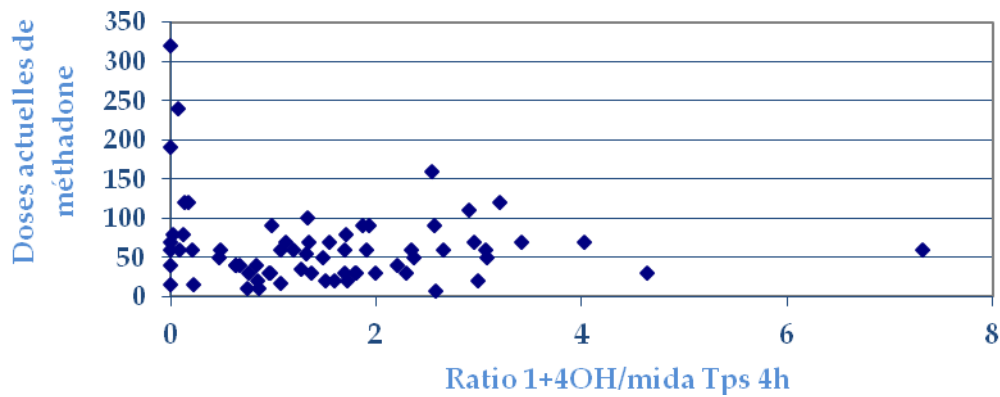
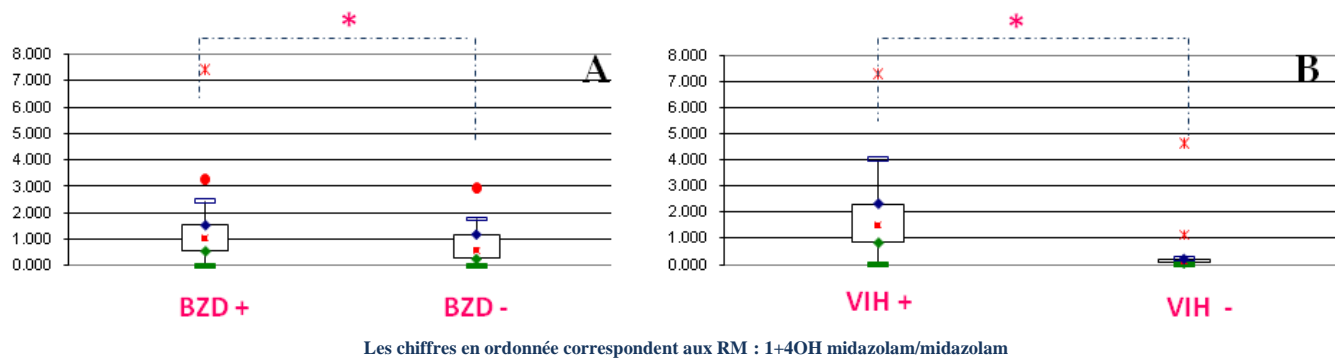


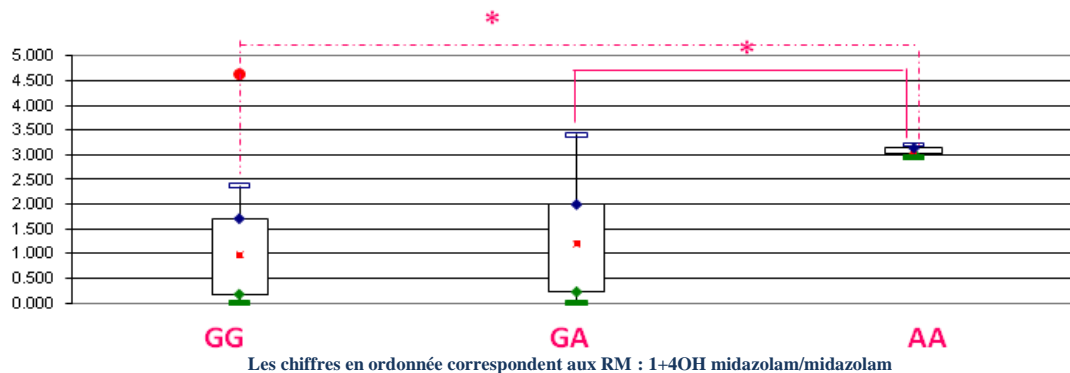
Figure 20 : Absence de corrélation entre la dose de méthadone à l'équilibre et le RM (Test de Spearman).



Les chiffres en ordonnée correspondent aux RM : 1+4OH midazolam/midazolam

Figure 21 :

- (A) RM à 30 min en fonction de la prise concomitante de BZD (groupe consommateur BZD+, non consommateur BZD-) ;
 - (B) RM à 4 h en fonction du statut VIH (patients VIH+ et patients VIH-).
- Les médianes et les quartiles sont représentés pour chaque groupe.



Les chiffres en ordonnée correspondent aux RM : 1+4OH midazolam/midazolam

Figure 22: RM à 4 h pour les trois génotypes du SNP c.189-6049 G>A (rs7804806) de POR. Les médianes et les quartiles sont représentés pour chaque groupe.

► **Influence de la variabilité génétique de *POR* et *CYP3A***

Le SNP rs7804806 G>A de *POR* était associé au RM à 4h (figure 22). Le RM à 4 h chez les patients homozygotes AA (n=3) est significativement plus élevé (RM=3,075) que chez les patients hétérozygotes GA (n=21, RM=0,97) et homozygotes GG (n=28, RM=1,198) (Kruskal-Wallis, $p<0,029$), **soit près de 3 fois plus élevé.**

En ne considérant que les patients VIH- (n=43) et malgré la réduction de la puissance statistique du fait de l'effectif analysé, l'association du RM avec le SNP rs7804806 reste significative (test KW, $p<0,024$). L'analyse après stratification des patients selon leur consommation de benzodiazépines n'a pas pu être conduite en raison des effectifs très faibles de certains génotypes (aucun patient AA pour le SNP en question).

La fréquence allélique du SNP de *POR* étudié n'était pas significativement différentes de celle décrite dans les populations caucasiennes européennes (HapMap, n=113, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> : la fréquence allélique référencée pour l'allèle minoritaire A du SNP rs7804806 G>A étant de 0,323 versus 0,26 dans notre population) (tableau 25).

Le nombre de copies de *CYP3A4* était de 2 en moyenne pour les 68 patients (1,8-2,3; NS) (figure 23). L'activité du CYP3A n'est donc pas corrélée au nombre de copies du *CYP3A4*, ni aux 18 SNPs explorés de *CYP3A4*, ni aux sept SNPs de *CYP3A5* pour les 52 patients caucasiens inclus dans l'analyse génétique.

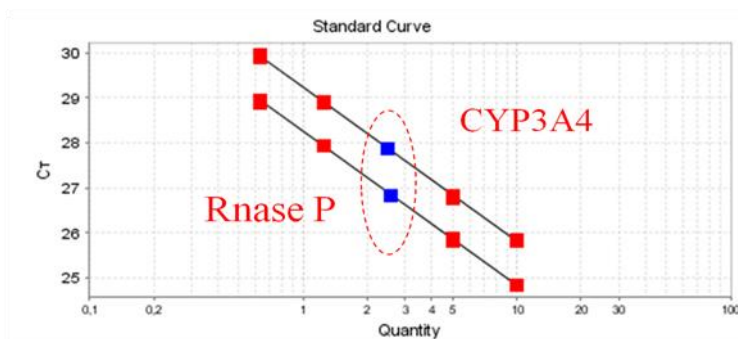


Figure 23: Analyse du nombre de copies de gène d'un patient sans modification du nombre de copie de gènes par rapport à la RNase P (nombre estimé à 2).

D- RELATIONS ENTRE GENOTYPES ET DOSES MAXIMALES OU ACTUELLES

La relation entre polymorphismes des gènes sélectionnés et les doses actuelles et maximales de méthadone est présentée dans le tableau 26. Les SNPs **c.118A>G** d'*OPRM1* et *TaqIA* de *DRD2* étaient significativement associés aux **doses maximales** de méthadone lorsqu'ils étaient considérés de façon isolés. Cependant, cette significativité disparaît après la correction de Holm pour comparaisons multiples (les valeurs de *p* corrigées et non corrigées sont présentées dans le tableau 26).

Tous les autres SNPs étudiés n'étaient associés ni aux doses actuelles ni aux doses maximales de méthadone.

Tableau 26: Association entre les SNPs étudiés et les doses actuelles et maximales de méthadone (mg/j).

	Gène	dbSNP	Allèle (A/a) ^a	Doses maximales n=98 ^b			<i>p</i>	<i>p_c</i> ^c	Doses actuelles n=98 ^b			<i>p</i>
				AA	Aa	aa			AA	Aa	aa	
PK	<i>ABCB1</i>	rs10456	C/T	(32) 80 [60-120]	(52) 90 [65-120]	(14) 80 [60-87,5]	0,81	-	(32) 60 [45-80]	(52) 53 [30-70]	(14) 45 [31,2-67,5]	0,29
	<i>CYP2D6</i> ^d	CNV	1/2/3ou4	(4) 65 [60-80]	(87) 80 [60-120]	(5+1) 75 [47,5-87,5]	0,12	-	(4) 45 [30-70]	(87) 60 [35-80]	(5+1) 50 [40-60]	0,57
	<i>POR</i> ^e	rs78048	G/A	(27) 80 [75-110]	(21) 80 [60-140]	(3) 70 [70-95]	0,95	-	(27) 60 [30-70]	(21) 50 [30-70]	(3) 70 [60-95]	0,49
PD	<i>OPRM1</i>	rs17999	A/G	(66) 85 [70-120]	(28) 80 [60-100]	(4) 52,5 [45-70]	0,03	0,24	(66) 60 [36,25-80]	(28) 57,5 [35-70]	(4) 52,5 [45-70]	0,71
CIRCUITS DE RECOMPENSE	<i>DRD2</i>	rs6277	T/C	(30) 80 [60-120]	(38) 80 [60-130]	(30) 80 [62,5-90]	0,51	-	(30) 55 [40-63,75]	(38) 60[36,25-70]	(30) 60 [30-87,5]	0,79
	<i>DRD2</i> (<i>TaqIA</i>)	rs18004	G/A	(67) 90 [65-120]	(23) 70 [60-85]	(8) 80 [60-120]	0,03	0,24	(67) 60 [40-90]	(23) 50 [30-70]	(8) 45 [15-80]	0,17
	<i>DBH</i>	rs16111	C/T	(63) 80 [60-120]	(30) 80 [60-107,5]	(5) 90 [40-100]	0,91	-	(63) 60 [40-80]	(30) 50 [30-67,5]	(5) 65 [40-90]	0,19
	<i>COMT</i>	rs4680	V/M	(35) 90 [60-130]	(41) 80 [60-90]	(22) 80 [70-107,5]	0,32	-	(35) 60 [30-85]	(41) 60[35-70]	(22) 50 [40-77,5]	0,9

Abréviations: ^a”A/a” correspondent à l’allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Les chiffres correspondent, pour chaque génotype, au nombre de patients en bleu entre parenthèses puis la médiane [quartile 25% - quartile75%].

^c *p_c* correspond aux valeurs de *p* obtenues après correction de Holm.

^d La présentation du nombre de copies du *CYP2D6* est la suivante : AA, 1 seule copie du *CYP2D6* ; Aa, 2 copies du *CYP2D6* ; aa, 3 ou 4 copies du *CYP2D6*.

^e L’analyse du *POR* a été déterminée, chez 52 patients équilibrés, pour le SNP significativement corrélé aux valeurs des RM du test au midazolam oral.

E- RELATION GENOTYPES-METHADONEMIES

Le tableau 27 présente les concentrations plasmatiques résiduelles rapportées aux doses de méthadone en fonction des profils génotypiques pour les SNPs et CNV étudiés. Aucune association significative n'a été retrouvée.

Tableau 27: Relation entre les SNPs étudiés et les concentrations plasmatiques résiduelles (ng/mL) rapportées aux doses.

Gène	dbSNP	Allèles (A/a) ^a	Méthadonémies résiduelles/doses ^b			p
			n=59			
			AA	Aa	aa	
<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	(16) 1,40 [1,31-2,37]	(34) 2,30 [1,57-2,9]	(9) 1,57 [1,14-2,5]	0,18
<i>CYP2D6</i> ^c	CNV	1/2/3ou 4	(3) 2,94 [2,64-3,02]	(51) 1,91 [1,29-2,82]	(4+1) 2,16 [1,5-2,28]	0,31
<i>POR</i> ^d	rs7804806	G/A	(26) 2,37 [1,31-2,89]	(18) 1,5 [1,17-1,80]	(3) 2,03 [1,86-2,62]	0,14
<i>OPRM1</i>	rs1799971	A/G	(40) 2,1 [1,51-2,9]	(17) 1,38 [1,27-2,52]	(2) 2,36 [2,13-2,58]	0,49
<i>DRD2</i>	rs6277	T/C	(19) 2,43 [1,37-2,99]	(23) 1,58 [1,27-2,35]	(17) 2,16 [1,51-2,97]	0,19
<i>DRD2</i>	rs1800497	G/A	(41) 2,33 [1,42-2,90]	(13) 1,39 [1,27-1,95]	(5) 1,94 [1,68-2,37]	0,14
<i>TaqIA</i>						
<i>DBH</i>	rs1611115	C/T	(41) 2,04 [1,33-2,90]	(16) 1,66 [1,27-2,48]	(2) 1,87 [1,72-2,01]	0,65
<i>COMT</i>	rs4680	Val/Met	(21) 1,82 [1,33-2,80]	(28) 1,94 [1,27-2,94]	(10) 2,10 [1,66-2,76]	0,62

Abréviations: ^a "A/a" correspondent à l'allèle majoritaire (A) et minoritaire (a).

^b Les chiffres correspondent, pour chaque génotype, au nombre de patients en bleu entre parenthèses puis la médiane [quartile 25% - quartile 75%].

^c La présentation du nombre de copies du *CYP2D6* est la suivante : AA, 1 seule copie du *CYP2D6* ; Aa, 2 copies du *CYP2D6* ; aa, 3 ou 4 copies du *CYP2D6*.

^d L'analyse du *POR* a été déterminée, chez 52 patients équilibrés, pour le SNP significativement corrélé aux valeurs des RM du test au midazolam oral.

II.2.5- DISCUSSION

Les doses nécessaires à l'équilibre thérapeutique sont extrêmement variables dans notre population de 81 patients anciens héroïnomanes répondeurs au traitement de substitution par la méthadone, de 7 à 320 mg. Par ailleurs, environ 26 % des patients n'ont pas répondu, comme cela a été observé en Suisse et en Espagne (Crettol 2008.a, Fonseca 2011).

Une étude espagnole récente, similaire dans ses effectifs au projet METHADOSE (76 répondeurs et 28 non répondeurs), a cherché à identifier des facteurs génétiques impliqués dans la variabilité pharmacocinétique de la méthadone (Fonseca 2011). Aucune association entre de nombreux SNPs de CYP impliqués dans le métabolisme de la méthadone (CYP3A4, 3A5, 2C9, 2C19, 2B6 et 2D6), et d'*ABCB1* et la réponse au traitement n'a pu être mise en évidence. Par contre, les patients métaboliseurs rapides ou lents pour le CYP2D6 semblent nécessiter respectivement des doses de méthadone supérieures ou inférieures par rapport aux métaboliseurs intermédiaires, mais l'absence de correction de la valeur de *p* pour les comparaisons multiples dans cette étude rend cette conclusion discutable.

De nombreux SNPs et deux CNV de gènes susceptibles d'affecter la pharmacocinétique et la pharmacodynamie (cible et circuits de récompense) de la méthadone ont été examinés dans le cadre de notre étude afin de déterminer si certains facteurs pourraient être associés d'une part à la réponse au traitement (répondeur *versus* non répondeur) et d'autre part aux doses maximales et actuelles de méthadone ainsi qu'aux concentrations plasmatiques résiduelles ajustées aux doses.

A- TEST AU MIDAZOLAM ORAL

Le test au midazolam oral mesure l'activité CYP3A intestinale et hépatique. C'est un test long, pratiqué en milieu hospitalier, qui peut être contre-indiqué chez les patients ayant une hypersensibilité connue aux benzodiazépines, une insuffisance respiratoire ou une dépression respiratoire aiguë.

La grande variabilité des RM observée dans notre étude pour le test au midazolam oral a déjà été rapportée (Floyd 2003, Zhu 2003, Villeneuve 2000). Soixante-dix à 90% de la variabilité de la fonction des CYP3A est attribuée à des facteurs génétiques et cliniques.

A.1- Effets du statut VHC ou HIV sur le test au midazolam :

Dans notre cohorte, il est apparu que les patients VIH+ avaient une activité métabolique du CYP3A multipliée par 11 en moyenne par rapport à celle des patients VIH-. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Jetter et al (2010) qui ont rapporté une activité enzymatique du CYP3A réduite chez 30 patients VIH+ non traités. Les auteurs ont ainsi montré que les patients VIH+ avaient une activité enzymatique en moyenne 50% moindre que celle des volontaires sains (Jetter 2010). Cette contradiction est peut être liée au faible nombre de patients VIH+ inclus (9 patients) et devra être confirmée sur un nombre plus important de patients.

A.2- Effets des médicaments co-administrés :

Dans notre étude, les patients BZD+ avaient une activité du CYP3A environs deux fois plus importante que les patients BZD-. Les benzodiazépines sont souvent prescrites avec la méthadone afin de réduire l'anxiété lors des traitements de substitution. A notre connaissance, aucune étude n'a été publiée concernant l'effet de la prise de benzodiazépines sur le test au midazolam. Une étude a cependant montré que la prise de benzodiazépines métabolisées par le CYP3A4 était associée à des concentrations plasmatiques de (R)-méthadone (rapportées aux doses) plus importantes, suggérant une inhibition compétitive au niveau du CYP3A4 (Hallinan 2009).

Dans notre étude, la consommation de BZD était attestée par une recherche immunochimique dans les urines sans distinction des molécules spécifiquement métabolisées par le CYP3A4. Contrairement à l'observation d'Hallinan et al (2009), la prise de BZD n'était pas, dans ce travail, associée à une différence significative des taux plasmatiques de (R)-méthadone.

A.3- Effet de la variabilité du CYP3A4 :

- ▶ *liée au nombre de copies de gènes*

Une seule étude a mis en évidence une variation du nombre de copies de *CYP3A4* dans une lignée cellulaire dérivée d'un clone tumoral (Lamba 2006). Tous les patients inclus dans notre

étude présentait deux copies du gène *CYP3A4*. Par conséquent, la variation du nombre de copies du *CYP3A4* ne participe pas à la variabilité observée pour l'activité du CYP3A.

► *liée aux polymorphismes des cytochromes*

Dans notre étude, le SNP rs4646437 du *CYP3A4* n'était pas associé au test au midazolam oral, ni les SNPs de *CYP3A5*, ce qui est en accord avec l'étude de Lepper et al. (2005) menée sur une population de 58 patients cancéreux. Dans la littérature, un seul SNP identifié au niveau de l'intron 7 de *CYP3A4* (rs4646437 C>T) a été associé *in vitro* avec l'expression et l'activité enzymatique de CYP3A4 chez les femmes. Les femmes porteuses du variant nucléotidique T avaient une expression et une activité significativement plus importante que les hommes porteurs de l'allèle T et les hommes homozygotes CC (Schirmer 2007). Ces résultats sont controversés (Oneda 2009).

► *liée à la POR*

Dans notre étude, un SNP intragénique de *POR* (rs7804806; figure 24) est associé à l'activité du CYP3A mesurée par le test au midazolam: les patients homozygotes AA ont une activité métabolique environ trois fois plus importante que celle des patients hétérozygotes et sauvages. Cette association génétique est toujours significative chez les patients VIH- et résiste à la correction des comparaisons multiples. La POR est codée par le gène *POR* situé sur le chromosome 7q11.2 et constitué de 16 exons (Figure 24).

L'évaluation des modifications des RM chez les patients VIH- et ne consommant pas de BZD sera à mener afin d'écarter des corrélations entre ces traits cliniques et ce SNP.

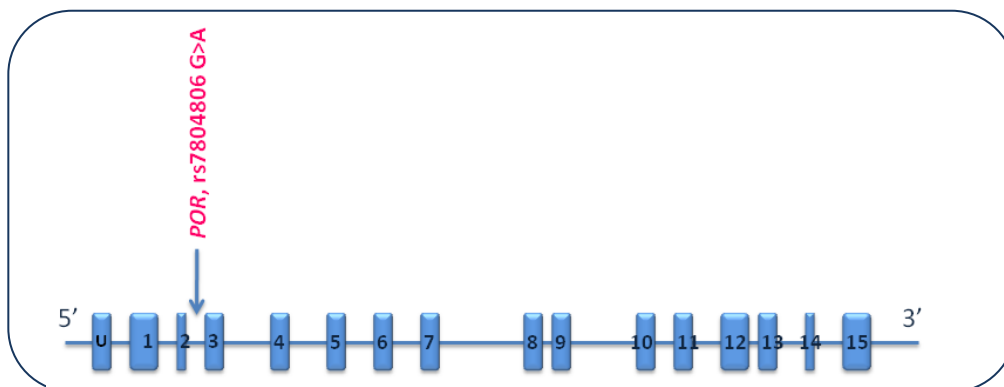


Figure 24: Représentation schématique de la structure du gène *POR* et de la localisation du SNP significativement associé au test au midazolam oral.

Une étude récente a montré que l'impact d'un SNP déterminé sur la fonction du CYP3A était différent en fonction du substrat du CYP3A4, très probablement à cause d'un changement conformationnel spécifique (Agrawal 2010 ; figure 25).

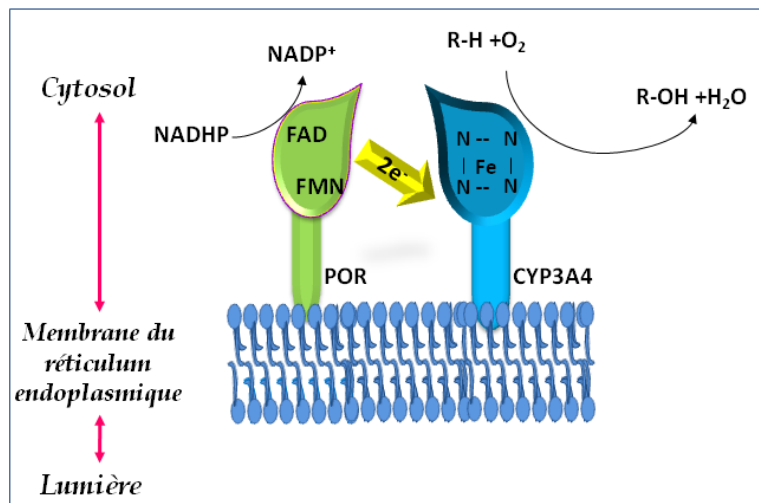


Figure 25 : Représentation schématique de la relation entre P450 oxydo-réductase (POR) et le CYP3A4.

La POR permet, par transfert d'électrons au CYP3A4, la catalyse et l'oxydation des xénobiotiques tel le midazolam (adaptée de Huang 2008, Miller 2005, Agrawal 2010).

Ce changement conformationnel modifie l'interaction électrostatique entre la flavine (FMN) de la POR et le site de liaison au CYP essentiel au transfert d'électrons pour la réaction d'oxydation du substrat.

Le SNP que nous avons analysé n'a pas fait l'objet d'étude particulière dans la littérature. Trois logiciels de prédiction de sites d'épissage (*NNsplice*, *Splice Site Analysis* et *NetGene2*) ont été utilisés afin de déterminer si ce SNP est fonctionnel par modification de l'épissage des transcrits de *POR*. Deux des trois programmes positionnent un site accepteur d'épissage immédiatement en 5' du rs7804806 dans la séquence suivante :

INTRON----->[EXON POTENTIEL

cactttctgttttcaccaaAG(g/a)ctggcgtttccaaccatta

Les scores de prédiction de chacun de ces algorithmes sont assez élevés mais insuffisamment tranchés néanmoins entre les deux allèles G et A (*NNsplice*, G : 0,94 vs A : 0,86 ; *Splice Site Analysis*, G : 0,85 vs A : 0,826) pour, en ne se reposant que sur cette analyse bioinformatique, supposer que le SNP contrôle un épissage alternatif du transcrit primaire de *POR*.

Il reste à déterminer si ce SNP se trouve en déséquilibre de liaison avec un polymorphisme fonctionnel proche qui modulerait l'interaction entre POR et le CYP. Le séquençage du gène *POR* apporterait cette information.

En conclusion, la prise de BZD, l'infection par le VIH et un SNP de *POR* sont associés aux résultats du test au midazolam chez nos patients traités par la méthadone : des études sur des populations plus larges seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

Cependant, ce test n'est corrélé ni à la réponse au traitement, ni aux doses de méthadone, ni aux concentrations plasmatiques résiduelles rapportées aux doses.

B- REPONSE AU TRAITEMENT, DOSES ET TAUX PLASMATIQUES DE METHADONE

Les études de pharmacogénétique évaluant les relations entre des SNPs ponctuels et la réponse au traitement, les doses et les taux plasmatiques de méthadone dans des cohortes de patients traités par cette molécule pour substitution aux opiacés, ainsi que la comparaison avec nos résultats sont résumés dans le tableau 28.

B.1- Réponse au traitement

Concernant le volet pharmacocinétique, les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de Fonseca et al. (2011) qui n'ont pas montré d'association entre le SNP c.3435C>T d'*ABCB1* et la réponse au traitement sur une population de 105 patients (76 répondeurs versus 29 non répondeurs).

Concernant le volet pharmacodynamique, nous n'avons trouvé aucune association significative des différents SNPs étudiés avec la réponse au traitement, en accord avec les résultats de Crettol et al. (2008a) pour le polymorphisme c.118A>G d'*OPRM1*.

Une association entre le SNP c.957C>T de *DRD2* avec la réponse à la méthadone a été publiée en 2008, les patients homozygotes sauvages CC présentant une moins bonne réponse au

traitement avec une valeur de p discrètement significative ($p=0,05$) (Crettol 2008.a). Dans notre population, ce SNP n'est pas associé à la réponse au traitement. En ce qui concerne le SNP TaqIA de *DRD2/ANKK1*, nos résultats sont en accord avec les données de deux cohortes de patients traités par méthadone (Crettol 2008.a, Barratt 2006) qui n'ont pas montré d'association entre ce SNP et la réponse au traitement.

B.2- Doses et concentrations plasmatiques

Nous n'avons pas retrouvé dans notre cohorte, en accord avec Fonseca et al. (2011), l'association du SNP c.3435C>T d'*ABCB1* à la dose quotidienne de méthadone précédemment publiée (Levrain 2008, Collier 2006, Crettol 2008.b) ni l'association avec les concentrations plasmatiques de (R,S)-méthadone (Crettol 2006, Levrain 2008). Le nombre de patients présentant une perte ($n=4$) ou un gain de copies ($n=5$) de *CYP2D6* était trop faible pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives. L'association entre des variants génétiques de *CYP2D6* a été publiée précédemment (Eap 2001, Crettol 2006, Lötsch 2006.b, Fonseca 2011, cf. **tableau 12**). De nombreux autres polymorphismes déterminant le profil métaboliseur lent ou rapide pourraient à présent être explorés.

Le rs6275 C>T de *DRD2* a été associé aux doses actuelles et maximales de méthadone dans une cohorte de 85 patients substitués par la méthadone (Doehring 2009). L'allèle T était associé dans cette publication à un besoin accru de méthadone. Nous ne confirmons pas ce résultat.

Néanmoins, il est à noter qu'avant correction de Holm pour comparaison multiple, les **SNPs TaqIA de *DRD2/ANKK1* et c.118A>G d'*OPRM1*** étaient associés à la dose de méthadone maximale avec une valeur de p **significative** ($p=0,035$ et $p=0,03$ respectivement).

Nous avons effectué ici des comparaisons multiples, comme dans nos études précédentes, ce qui soulève la problématique des corrections statistiques qui ne sont pas appliquées systématiquement dans les études publiées (par exemple Fonseca et al. 2011) et constituent un obstacle à leur comparaison et à leur interprétation. Nous avons opté pour la correction de Holm (1979) appliquée aux comparaisons multiples, variante de celle de Bonferroni qui est

considérée comme plus sensible que cette dernière, c'est-à-dire plus apte à détecter un effet s'il existe.

La mise en application de ces corrections reste débattue. En effet, d'un côté elles protègent contre l'inflation du risque alpha, qui correspond à l'erreur de type I, soit le risque de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie. Ainsi, ces corrections, en baissant le seuil de significativité de p en fonction du nombre de tests effectués permettent de réduire le risque de sélection de faux positifs. Par contre, en diminuant la sensibilité du test, elles augmentent la probabilité de ne plus détecter les vrais positifs (Abdi 2010). Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de présenter les valeurs de p avec et sans correction. En effet, même si certaines analyses concluent à l'absence de différence significative après correction, les résultats proches de la significativité pris individuellement, méritent probablement d'être réévalués avec un nombre de patients plus important qui permettra d'augmenter la puissance des tests statistiques. C'est probablement le cas des deux SNPs d'*ANKKI* et *OPRMI* que nous avons étudiés.

Le tableau 28 récapitule les principales données bibliographiques présentées dans ce paragraphe, accompagnées des valeurs de p assorties de la précision de l'application de la correction ou non liée aux comparaisons multiples.

Tableau 28: Etudes de pharmacogénétique dans des cohortes de patients traités par la méthadone ; comparaison avec nos résultats.

Etude	Nombre de patients et origine	Gènes	SNPs	Résultats ¹			Corrections pour comparaisons multiples	Concordance avec nos résultats Oui (+)/ Non (-)
				Association à la réponse au traitement ²	Association aux doses de méthadone	Association aux concentrations de méthadone		
Crettol et al. 2006	245 (Suisse)	<i>ABCB1</i>	c.3435C>T	-	-	Oui, concentrations CC> TT ($p=0,01$)	Non	(-)
Coller et al. 2006	60 (Australie)	<i>ABCB1</i>	Etude d'haplotypes : 5 SNPs dont c.3435C>T	-	Oui	-	Non	sans objet
Barrat et al. 2006	46 (Australie)	<i>DRD2/ANKK1</i>	Taq1A	Non ($p=1$)	-	-		(+)
Levrin et al. 2008	98 (Israël)	<i>ABCB1</i>	c.3435C>T	-	Oui, doses TT 3 fois plus importantes que les patients CC ou CT ⁴ (p non précisé)	-	Non	(-)
Crettol et al. 2008.a	238 (Suisse)	<i>OPRM1</i>	c.118A>G	Non ($p=0,3$)	Non	-	Non ³	(+)
		<i>DRD2/ANKK1</i>	Taq1A	Non ($p=0,9$)	Non	-	Non	(+)
		<i>DRD2</i>	c.957C>T	Oui, CC plus fréquemment non répondeurs que TT ($p=0,05$)	Non ($p=0,12$)	-	Non	(-)

Doehring et al. 2009	85 (Allemagne)	DRD2	c.957C>T	Non ($p=1$)	Oui, les patients porteurs de l'allèle T avaient des doses actuelles ($p=0,016$) et maximales ($p=0,005$) significativement plus importantes que les non porteurs	-	Oui, correction de Bonferroni	(-)
		DRD2/ANKK1	Taq1A	Non ($p=0,056$)	-	-		(+)
Fonseca et al. 2011	105 (Espagne)	ABCB1 CYP2D6 CYP2D6	c.3435C>T Génotypes Phénotypes	Non ($p=0,266$) Non ($p=0,211$) Oui, UM étaient répondeurs et aucun UM n'était non répondeur ($p=0,032$)	Non Non Oui, doses UM >EM ($p=0,043$)	Non Non Oui, concentrations UM>EM ($p=0,002$)	Non Non Non	(+) (+) (-)

Abréviations: EM=*Extensive metabolizers* ou métaboliseurs normaux, UM=*Ultrarapid metabolizers* ou métaboliseurs ultrarapides.

¹ La valeur de p a été mentionnée entre parenthèse quand cette valeur a été renseignée dans l'article.

² L'association à la réponse au traitement a été évaluée par la comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les patients répondeurs et non répondeurs.

³ Aucune correction n'a été réalisée, cependant les auteurs mentionnent que les valeurs de p comprises entre 0,05 et 0,01 devraient être interprétées avec prudence vu le nombre de SNPs analysés.

⁴ Une analyse univariée utilisant la dose de méthadone comme variable quantitative n'est cependant pas significative.

II.2.6- LIMITES DE L'ETUDE

Cette étude présente un certain nombre de limites liés notamment à la difficulté d'inclure des patients toxicomanes dans des études de recherche clinique. Une première limite est **l'hétérogénéité phénotypique des patients suivis** (comorbidités psychiatriques, infections, etc.) ainsi que **la prise concomitante non déclarée d'autres substances** (médicaments ou substances illicites). Ainsi, l'existence de certaines interactions médicamenteuses ou médico-toxiques intervenant sur les traits phénotypiques observés ne peut être exclue.

Le manque d'observance au traitement, l'absentéisme aux consultations de suivi de traitement, les arrêts prématurés de l'étude des patients participent également à ces difficultés.

Par ailleurs, nous ne disposons pas de toutes les données, en particulier chez les patients non répondeurs (test au midazolam oral, méthadonémies). Le test au midazolam était par ailleurs contre-indiqué chez certains des patients répondeurs. Le nombre de patients inclus dans certaines analyses est donc relativement faible par rapport au nombre initial de patients inclus, réduisant la puissance des tests statistiques, ce qui constitue un des principaux obstacles de la recherche clinique.

Enfin, nous avons procédé, dans notre étude d'association, à l'étude d'un seul polymorphisme par gène d'intérêt (en dehors des polymorphismes de gènes présents sur les puces). Dans ce type d'approche «gène candidat», l'effet de l'interaction entre différents SNPs du même gène ou de gènes différents n'est pas recherché. Cependant, une analyse génomique globale (Puces Illumina) incluant l'ensemble des données obtenues est actuellement en cours (Biostatisticien, Dr Torres ; Fondation Imagine, Université Paris Descartes).

II.2.7- CONCLUSIONS

Après correction de Holm, aucun des polymorphismes étudiés dans notre travail n'est associé avec la **réponse au traitement**. Une tendance vers la significativité peut être décelée pour les SNPs **TaqIA de *DRD2/ANKK1*** et **c.118A>G d'*OPRM1*** et incite à **poursuivre**

l'étude de leur fréquence dans une population de patients plus importante afin d'augmenter la puissance du test statistique.

La prise de **BZD**, l'infection par le **VIH** et un polymorphisme de **POR** sont associés à l'activité du complexe **CYP3A** mesuré par le test au midazolam chez des patients traités par la méthadone. Une meilleure compréhension des facteurs de variabilité de ce test pourrait permettre de reconsidérer son champ d'application, ce test étant long et interventionnel, et présentant des contre-indications formelles.

II.3- INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES IMPLIQUANT LA METHADONE : MISE EN PLACE D'UN MODELE *IN VITRO* (EVALUATION DE L'INTERACTION METHADONE-DULOXETINE)

II.3.1- OBSERVATION CLINIQUE

Les psychiatres cliniciens de l'unité au sein de laquelle j'effectuais ma thèse ont rapporté la première description clinique d'une interaction entre la méthadone et la duloxétine (Vorspan et al. 2010 ; **Annexe 5**). Le patient, traité de manière chronique par la méthadone, présentait des symptômes de surdosage aux opiacés : sueurs, vertige, fatigabilité et prurit à la suite de l'introduction de la duloxétine. Deux hypothèses pouvaient être proposées afin d'expliquer cette interaction : la première était l'inhibition du CYP2D6 par la duloxétine pouvant être aggravée par un profil de type « métaboliseur lent » du CYP2D6. L'étude moléculaire que j'ai entreprise à cette occasion a mis en évidence deux copies du gène *CYP2D6* chez ce patient excluant l'hypothèse d'une sous-expression du cytochrome par perte de copie. La deuxième hypothèse soulevée était celle d'une interaction des deux molécules au niveau de la P-gp.

Afin d'explorer cette deuxième hypothèse, j'ai utilisé un modèle cellulaire mis en place préalablement dans l'Unité (Tournier 2010) permettant l'exploration *in vitro* de ce type d'interactions médicamenteuses faisant intervenir la P-gp.

II.3.2- MATERIELS ET METHODES

a- Lignée cellulaire utilisée

Le modèle cellulaire utilisé était la lignée MDCKII-MDR1 (fournies par Alfred Schinkel (*National Cancer Institute*, Pays-Bas)), une lignée épithéliale de rein de chien surexprimant la P-gp. Cette lignée immortalisée permet *in vitro* de mettre en place un modèle de transport bidirectionnel à travers une couche unicellulaire.

b- Conditions de culture

Les conditions de culture ont été telles que décrites par Tournier et al. (2010). Brièvement, les cellules étaient cultivées en milieu DMEM, additionné de 10% de sérum de veau fœtal, de 1% de glutamine et de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL, Invitrogen). La

culture s'est effectuée à 37°C, sous 95% air/ 5% de CO₂ en flasques de 75 mL. A confluence, les cellules ont été dissociées par la trypsine-EDTA (Gibco) puis mises en culture sur un système Transwell à 12 puits (*Corning Costar Transwell polycarbonate membranes -ATGC- ; 3 x 10⁵ cellules/cm²*), afin de permettre l'établissement d'une polarité cellulaire. Ce système comprend deux compartiments : le compartiment supérieur (A) de 0,5 mL tapissé des cellules MDCK-MDR1 et le compartiment inférieur (B) de 1,5 mL (figure 26). La résistance transépithéliale a été déterminée en utilisant une ERS Millicell ohm-mètre (Millipore) avant et après incubation afin de s'assurer de l'intégrité de la monocouche. Les monocouches ayant une résistance transépithéliale de moins de 200 Ω.cm² ont été rejetées.

c- Réalisation du test

Les cellules ont été incubées avec de la (R, S)- méthadone (500 ng/mL) en présence de différents xénobiotiques suivant le schéma expérimental présenté (figure 26). Nous avons opté pour la technique de transport avec concentration à l'équilibre (*Concentration equilibrium transport assay -CETA-*) : la méthadone a d'abord été ajoutée à une concentration identique (500 ng/μL) des deux côtés de la monocouche de cellules surexprimant la P-gp, plutôt que de l'appliquer seulement au côté apical ou basolatéral (Luna-Tortos 2008). Brièvement, le tampon de préincubation a été éliminé par aspiration puis remplacé dans les deux compartiments par le même tampon contenant les molécules à tester: la PSC833 (5 μM), un inhibiteur connu de la P-gp et deux concentrations de duloxétine (10 μM et 50 μM). Les concentrations de méthadone et de duloxétine choisies ont été les concentrations sériques thérapeutiques (Giacomini 2010, Waldschmitt 2007, Waldschmitt 2009). Les cellules ont été ensuite placées à 37°C pour 3 h sous atmosphère humide et agitation afin de permettre le transport médié par la P-gp. Les concentrations initiales et finales de (R)-, (S)- et (R,S)-méthadone, dans le compartiment apical (A) et basolatéral (B), ont été déterminées à la fin de l'incubation. Chacun des points expérimentaux a été réalisé trois fois.

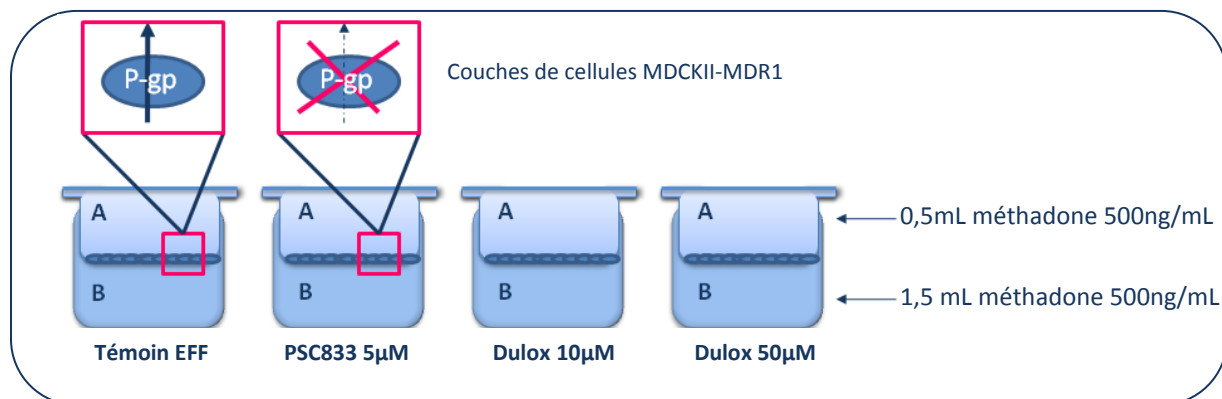


Figure 26 : Modèle cellulaire d'étude de l'interaction entre la duloxétine et la méthadone.

A : compartiment « apical » ; B : compartiment « basolatéral » ; Dulox : Duloxétine ; Témoin EFF : témoin d'efflux.

d- Mesure des concentrations

Les concentrations de méthadone ont été déterminées par chromatographie liquide-spectrophotométrie de masse (LC-MS, TSQ Quantum Ultra, Fisher)⁷.

e- Analyse statistique

Les rapports A/B des concentrations de méthadone ont été calculés pour chaque condition expérimentale. La comparaison des conditions obtenues pour le témoin d'efflux et le témoin d'inhibition de l'efflux (PSC833) a été faite par un test de MW. Le nombre de réplicats étant faible, nous n'avons pu procéder à une vérification de la normalité de la distribution des points. Les résultats de la régression linéaire simple sont donnés à titre indicatif. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel StatEl (version 2.5).

II.3.3- RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des rapports A/B des concentrations de (R,S)-méthadone sont représentés sur la figure 27.

⁷ Service de Pharmacie-Pharmacologie-Toxicologie, Hôtel Dieu, Paris - Dr Labat-Deveaux.

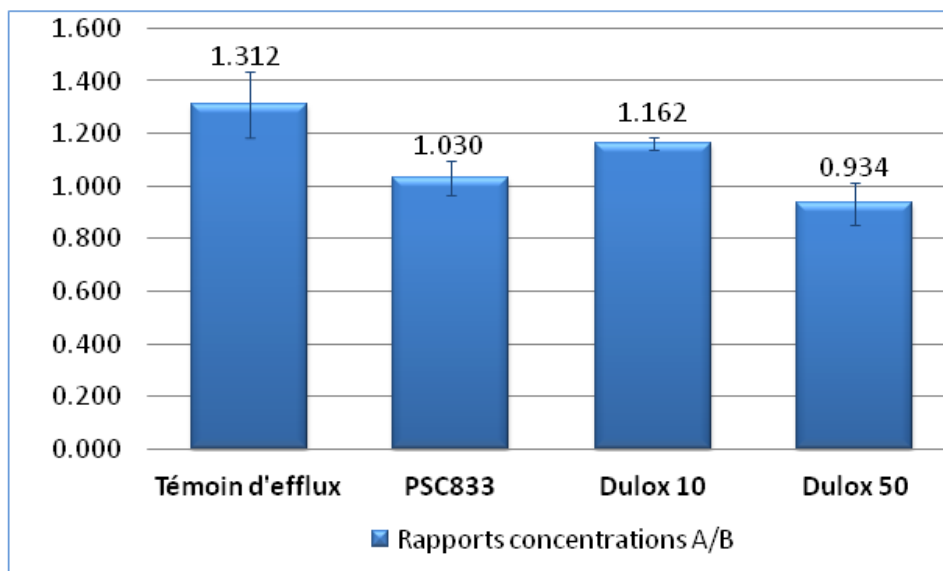


Figure 27 : Rapports de concentrations de méthadone du compartiment apical (A) sur celles du compartiment basolatéral (B). Les écarts types sont représentés par les segments.

La méthadone est effluée par la P-gp depuis le compartiment B vers A en conditions standard (Témoin d'efflux). Lorsque la P-gp est inhibée (en présence de PSC833), le rapport est égal à 1, montrant l'absence d'efflux. Le test de MW entre le témoin d'efflux et chacune des concentrations de duloxétine donne une probabilité exacte de 0,05 lors de la comparaison de ces deux conditions expérimentales. Le nombre de réplicats ($n=3$ pour chaque condition) est faible pour permettre une analyse de régression linéaire entre le niveau d'efflux et les concentrations de duloxétine. Cependant, les résultats de l'analyse statistique donnés à titre indicatif suggèrent **un effet dose de l'inhibition du transport via la P-gp.**

L'évaluation des rapports de (R)- et de (S)-méthadone dans ces différentes conditions expérimentales a donné les mêmes résultats. Cette absence de stéréosélectivité du transport a été déjà démontrée (Tournier 2010).

II.3.4- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces résultats préliminaires suggèrent une **inhibition de l'efflux de la méthadone par la P-gp en présence de duloxétine dans le modèle *in vitro* utilisé.**

Nous ne disposons pas des concentrations plasmatiques de duloxétine chez le patient ce qui constitue une des limites de cette observation (patient non compliant). Cependant, nous avons

utilisé des concentrations de duloxétine similaires à celles obtenues lors d'un traitement par une posologie usuelle de 60 mg/jour. **Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les effets de surdosage de la méthadone observés chez ce patient pourraient être liés à l'inhibition de la P-gp par la duloxétine.**

Une confirmation de ces résultats ainsi qu'une évaluation de la concentration inhibitrice à 50% de la duloxétine (inhibiteur) sur la P-gp (CI 50) sont nécessaires. Une fois cette détermination réalisée, une évaluation *in vivo* dans un modèle murin de l'interaction pourrait être envisagée suivant les recommandations publiées dans la littérature (*The International Transporter Consortium*, Giacomini 2010).

II.4- EVALUATION DES FACTEURS GENETIQUES IMPLIQUES DANS LES EFFETS SECONDAIRES CARDIAQUES DE LA METHADONE

II.4.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE ET HYPOTHESE DE TRAVAIL

La méthadone présente de nombreux effets secondaires qui peuvent dépendre de la dose et de la durée du traitement. Le risque de dépression respiratoire associé au surdosage reste sans doute l'effet indésirable le plus redoutable, notamment lors de l'administration concomitante de la méthadone avec d'autres médicaments dépresseurs du SNC.

Cependant, les effets secondaires cardiaques mettent également en jeu le pronostic vital. Certains patients traités par la méthadone présentent des allongements de l'espace QT, objectivés à l'ECG (dus au retard de la repolarisation ventriculaire), pouvant entraîner des Tdp (arythmie ventriculaire) potentiellement mortelles. Ces accidents sont d'autant plus graves lorsque la méthadone est associée à d'autres drogues (essentiellement alcool et cocaïne) ou de médicaments susceptibles d'allonger le QT (De Bels 2003, Gil 2003, Butler 2011) (*cf. paragraphe III.5.3.d- Effets indésirables de la méthadone*). La fréquence des allongements du QT dans les populations de patients substitués par la méthadone constitue un effet secondaire grave et dont la fréquence est éminemment variable selon les études publiées (de 16 à 83% selon les études) (Fanoë 2007, Peles 2007, Ehret 2006, Maremmanni 2005). La prévalence de ces allongements semble variable selon que la méthadone est utilisée comme traitement substitutif ou en analgésie.

Nous avons étudié des facteurs cliniques et génétiques potentiellement associés aux allongements du QTc pour des patients inclus dans le protocole METHADOSE. Nous disposions en effet des génotypes des patients réalisés par hybridation sur la puce Illumina (*cf. paragraphe II.2.3- Matériels et Méthodes*). Parce qu'ils sont directement impliqués dans le mécanisme de repolarisation cardiaque ainsi que dans les syndromes congénitaux d'allongement du QT (*Congenital long QT syndrom*), j'ai sélectionné les gènes **des canaux cardiaques potassiques et sodiques** afin de tester leur association avec l'allongement du segment QT dans la cohorte de patients.

Mon objectif principal a été d'exploiter les génotypages issus de la puce Illumina, en choisissant et extrayant les données génotypiques à l'aide du logiciel en développement *Pharcra*, de saisir les données cliniques et de participer à l'analyse statistique afin d'établir les relations entre valeurs du QTc et facteurs cliniques et génétiques.

Ce travail fait l'objet d'un article soumis pour publication (A Hajj, K Ksouda, K Peoc'h, E Curis, A Messali, L Labat Deveaux, V Bloch, S Mouly, JM Scherrmann, JP Lepine, JL Laplanche, F Vorspan, A **KCNH2 polymorphism is a risk factor for QT prolongation in Methadone-Maintained Patients**, soumis le 25 Février 2012 à *Clinical Pharmacology and Therapeutics*).

II.4.2- PATIENTS ET METHODES

II.4.2.1- Patients

L'étude a été réalisée chez 95 patients traités par la méthadone (répondeurs et non répondeurs ; protocole METHADOSE) et pour lesquels un ECG avait été réalisé. Les patients inclus ne présentaient pas d'antécédents de maladies cardiaques ou de syncope inexpliquée.

Soixante treize pourcent des patients étaient des hommes, l'âge moyen étant de 42 ans. Cinquante deux patients (60%) étaient infectés par le VHC et 11 (12%) par le VIH. Les doses moyennes de méthadone étaient de 63 mg/jour (intervalle : 5-320 mg).

Les valeurs du QTc (QT corrigé à la fréquence cardiaque par la formule de Bazett : $QTc = QT(ms) \sqrt{QT(ms)/intervalle\ RR}$) ont été déterminées selon les normes suivantes (Goldenberg 2008, tableau 29). Le QTc moyen était de 415 ± 33 ms (moyenne \pm déviation standard; intervalle: 350-575 ms).

Tableau 29 : Valeurs seuils de l'allongement du QTc (ms) en fonction du sexe chez l'adulte.

	Homme	Femme
Normal	<430	<450
Limite	430-450	450-470
Allongé	>450	>470

II.4.2.2- Génotypage

Le génotypage de 82 patients caucasiens, pour lesquels un consentement avait été obtenu, a été réalisé à l'aide des puces à ADN (ou *microarrays*, Illumina, Réseau INSERM), à partir d'ADN génomique comme décrit précédemment (*cf. paragraphe II.2.3- Matériels et Méthodes*). Huit patients non caucasiens n'ont pas été inclus dans l'étude afin d'éviter les biais statistiques des différences génétiques inter-ethniques (Figure 28). Les résultats du génotypage par puces à ADN des gènes considérés ont été confirmés par PCR en temps réel (Applied Biosystems ; *cf. paragraphe II.2.3- Matériels et Méthodes*).

II.4.2.3- Analyses statistiquee

Les données cliniques sont présentées par les moyennes, l'écart type et les extrêmes. L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé en utilisant le test du χ^2 .

Un premier volet de l'étude a consisté en un criblage par une analyse univariée de facteurs cliniques et génétiques potentiellement impliqués dans les allongements du QT (une valeur de $p < 0,25$ a été retenue afin d'éviter d'omettre des variables importantes pour la suite de l'analyse). D'autres variables ont été conservées dans le second volet de l'étude en raison de leur impact décrit dans la littérature (sexe, qui conditionne les normales du QT ; statut VIH, l'infection étant associé à des allongements du QT).

Les variables retenues pour l'analyse univariée sont l'âge, le sexe, l'infection par le VIH et le VHC, la posologie de méthadone, les traitements associés ainsi que les génotypes pour les polymorphismes de gènes codant des canaux cardiaques potassiques et sodiques voltage-dépendant qui sont impliqués dans la repolarisation cardiaque (Tableau 30 et figure 29).

Les valeurs de QTc pour l'ensemble de la population ne pouvant être normalisées, des tests non paramétriques ont été réalisés (test de Spearman et MW). Les valeurs de QTc du groupe de patients VIH- présentaient une distribution normale et ont été analysées en utilisant le modèle linéaire : régression linéaire pour les variables quantitatives (âge, posologie de méthadone, nombre d'allèles des gènes étudiés, nombre de traitements associés), et une analyse de variance (Anova) pour les variables qualitatives (sexe, présence de l'allèle d'intérêt, présence d'un traitement associé, séropositivité) (le test t de Student est un cas particulier pour les variables binaires).

Des analyses de corrélation (tests de Wilcoxon) ont été conduites secondairement afin de sélectionner et d'éliminer les paires de variables pouvant biaiser l'interprétation du modèle de régression linéaire final (analyse multivariée avec les variables retenues suite aux analyses univariées et de corrélation).

Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team 2010).

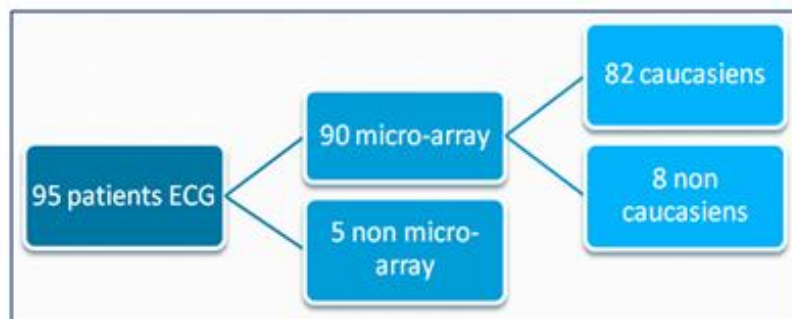


Figure 28: Inclusions de l'étude d'association de la méthadone avec le risque d'allongement du QTc.

Abréviations : micro-array : patients pour lesquels une analyse génétique par puces a été réalisée.

Au total, ont été inclus dans l'étude 95 patients pour lesquels nous disposons d'un tracé ECG.

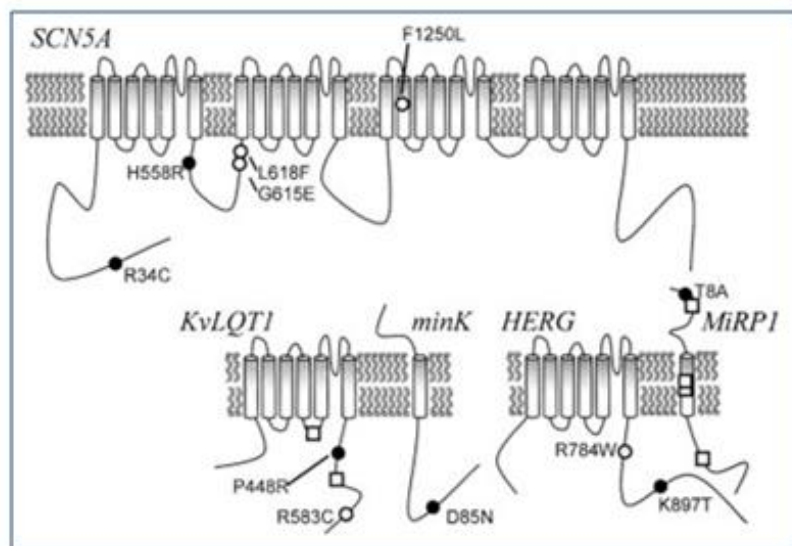


Figure 29 : Représentation schématique des canaux sodiques et potassiques cardiaques et de certains de leurs SNPs.

Abréviations :

SCN5A: Gène du canal sodique voltage-dépendant (type V, sous-unité alpha) ;

KvLQT1 (ou **KCNQ1**): Gène du canal potassique voltage-dépendant (sous famille KQT, membre 1) ;

HERG (ou **KCNH2**): Gène du canal potassique voltage-dépendant (sous famille H-reliée à eag-, membre 2) ;

MiRP1 (ou **KCNE2**): Gène du canal potassique voltage-dépendant (famille relié à Isk, membre 2).

dbSNP	Gène	SNP	Conséquence fonctionnelle
rs1805123	KCNH2	A>C	p.Lys897Thr
rs1805127	KCNE1	G>A	p.Ser38Gly
rs2236609	KCNE1	-50-129T>C	
rs1805124	SCN5A	A>G	p.His558Arg
rs2234916	KCNE2	A>G	p.Thr8Ala
rs1805128	KCNE1	G>A	p.Asp85Asn
rs7626962	SCN5A	G>T	p.Ser1103Tyr
rs6791924	SCN5A	A>G	p.Arg34Cys

Tableau 30: Liste des SNPs étudiés pour l'allongement du QTc chez les patients sous méthadone.

II.4.3- RESULTATS

II.4.3.1- Facteurs cliniques et allongements du QTc

Vingt patients parmi 73 (21,1%), tous des hommes, présentaient un QTc allongé dont 12 (12,6%) avec un QTc limite (*borderline*) et 8 (8,4%) avec un QTc allongé (figure 30). Deux patients présentaient un intervalle de QTc supérieur à 500 ms et un seul à 499 ms.

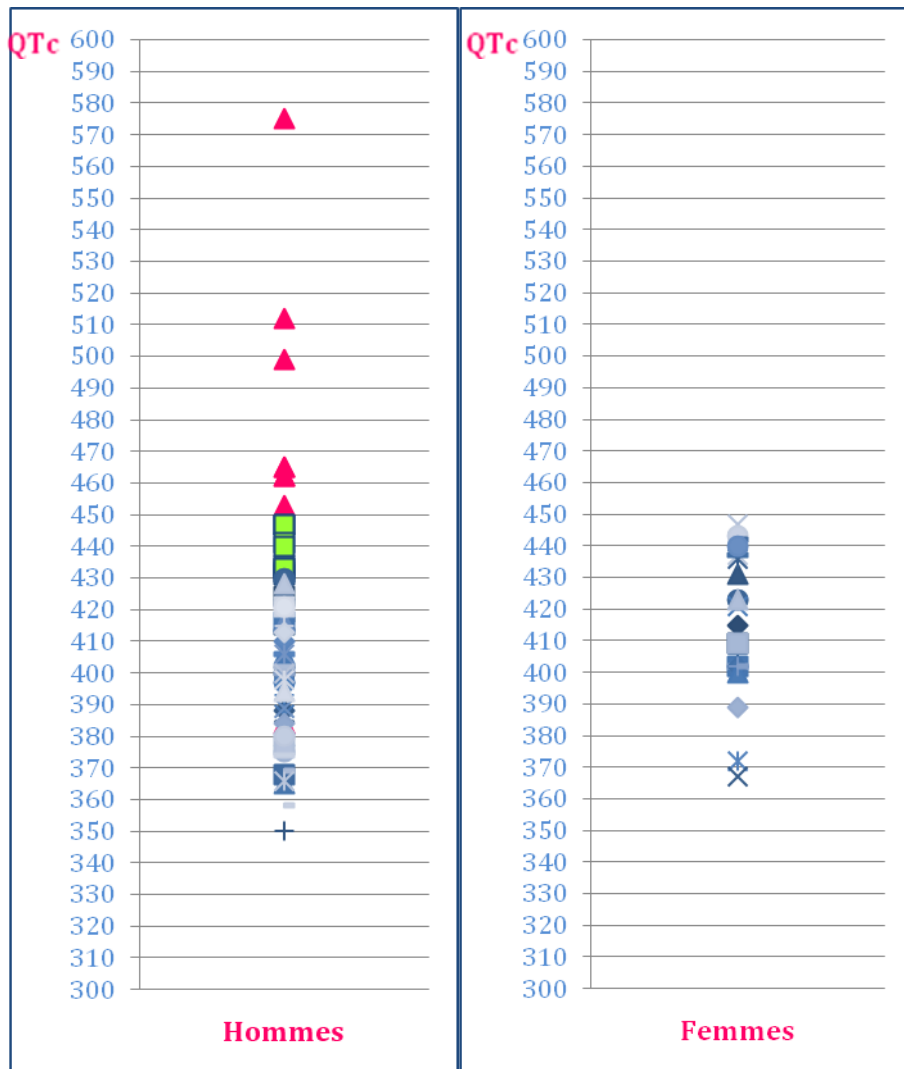


Figure 30 : Valeurs individuelles du QTc chez les patients en fonction du sexe.

Selon les valeurs seuils présentées dans le tableau 29 :

Les points en fushia correspondent à des valeurs de QTc allongé,

Les points en vert à des valeurs de QTc limite,

Les points en bleu à des valeurs de QTc normales.

II.4.3.2- Facteurs génétiques et allongements du QTc

Parmi les huit SNPs étudiés, quatre seulement se sont révélés polymorphes dans notre population : rs1805123 de *KCNH2*, rs1805127 et rs2236609 de *KCNE1* et rs1805124 de *SCN5A*

(tableau 30). Les fréquences génotypiques sont présentées dans le tableau 31. La distribution des génotypes ne s'écarterait pas de la loi de Hardy-Weinberg.

Seul le SNP rs1805123, codant une lysine (Lys) ou une thréonine (Thr) au codon 897 de *KCNH2*, était significativement associé à l'intervalle QTc ($p=0,001$; test de KW). Les fréquences alléliques étaient de 0,66 pour l'allèle A (897Lys) et 0,34 pour l'allèle C (897Thr) et ne différaient pas significativement de celles observées dans les populations contrôles (HapMap européen CEU, $n=113$, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La comparaison des patients porteurs d'au moins un allèle A (homozygotes AA et hétérozygotes AC) versus les patients porteurs du génotype CC a montré que la présence d'au moins un allèle 897Lys de *KCNH2* était associée à un allongement du QTc ($p=0,001$; test de KW).

II.4.3.3- Analyses statistiques

a- Analyses univariées

Les facteurs significativement corrélés à l'intervalle QTc avec un $p<0,25$ dans l'analyse univariée étaient l'âge, la posologie de méthadone, ainsi que le SNP rs1805123 de *KCNH2*. Les autres facteurs cliniques et génétiques n'étaient pas associés au QTc.

b- Analyses de corrélation

Dans la deuxième étape de l'analyse, les corrélations possibles entre les variables sélectionnées à partir de l'analyse univariée (c'est à dire l'âge et la posologie de méthadone) ont été examinées. Bien que les valeurs de p pour le sexe et le statut VIH, ne soient pas supérieures à la valeur seuil de 0,25, ces variables ont été conservées dans le modèle de régression linéaire de façon à prendre en compte les informations bibliographiques selon lesquelles les valeurs normales du QTc diffèrent selon l'âge et le statut VIH (Petrosillo 2006, Bai 2011).

Des corrélations complexes entre le sexe, le statut VIH et la posologie ont été mises en évidence ($p=3\times 10^{-4}$, test de Wilcoxon): les hommes infectés par le VIH recevaient des posologies de méthadone plus importantes et présentaient des valeurs de QTc également plus élevées, sans que ces résultats ne puissent être facilement interprétés. Une corrélation entre l'âge et le statut VIH est apparue de façon significative ($p=0,003$, test de Wilcoxon). Cette

corrélation n'apparaît pas de fait dans le groupe majoritaire des patients VIH- (n=71/82 ; 86,6% dans lequel sexe et posologie de méthadone ne sont pas corrélés ($p=0,35$, test de Wilcoxon)).

c- Analyses multivariées

Deux modèles de régression linéaire multivariée ont été construits pour prédire les valeurs du QTc incluant l'ensemble des variables retenues dans les analyses précédentes: l'âge, le sexe, le statut VIH, la posologie de méthadone ainsi que le nombre d'allèles 897Lys de *KCNH2* (0, 1 ou 2) (tableau 32). Le premier modèle incluait la totalité des 82 patients génotypés; ce modèle s'est avéré difficilement interprétable au vu de la complexité des interactions relevées dans le groupe de patients VIH+. Bien que ces corrélations complexes soient d'un intérêt clinique potentiel, le nombre limité de patients VIH+ (n=11) dans notre échantillon ne permet pas une analyse pertinente.

Par conséquent, un second modèle incluant uniquement les patients VIH- (n=71 sur 82, 86,6%) a été construit. Dans ce deuxième modèle, les variables potentiellement associées à la valeur du QTc n'étant pas corrélées, le seul facteur significatif retenu était le nombre d'allèle 897Lys de *KCNH2* ($p<0,007$ –tableau 32; expliquant 10% de la variance du QTc). Le QTc s'allonge de près de 13 ms par allèle 897Lys porté [Intervalle de confiance -IC- à 95% : 4-23 ms] chez les patients VIH-. Un allongement moyen du QTc de 15 ms [IC 95%: 4-25 ms] est observé dans la cohorte incluant l'ensemble des patients VIH+ et VIH-.

Tableau 31: Etude d'association entre les génotypes des SNPs des canaux cardiaques et la durée du QTc chez 82 patients caucasiens traités par la méthadone

Gène	dbSNP	Allèles (A/a)	Génotypes	p^a (KW)	p^b (ANOVA)
KCNH2	rs1805123	A/C; Lys897Thr	AA [36 (0.44)]; AC [36 (0.44)]; CC [10 (0.12)]	0,001	0,006
KCNE1	rs1805127	A/G; Ser38Gly	GG [32 (0.39)]; GA [36 (0.44)]; AA [14 (0.17)]	0,716	0,632
KCNE1	rs2236609	-50-129 T/C	AA [17 (0.21)]; GA [35 (0.43)]; GG [30 (0.37)]	0,817	0,751
SCNA5	rs1805124	A/G; His558Arg	AA [53 (0.65)]; AG [27 (0.33)]; GG [2 (0.02)]	0,338	0,391

Abréviations :

p^a : valeurs de p pour la totalité des patients caucasiens (n=82).

p^b : valeurs de p pour les patients VIH - (n=71).

KW : Kruskal-Wallis

ANOVA: Analyse de variance.

KCNE1 rs1805128 [p.Asp85Asn], KCNE2 rs2234916 [Thr8Ala], SCN5A rs6791924 [Arg34Cys] et SCN5A rs7626962 [Ser1103Tyr] n'étaient pas polymorphes dans notre population de patients.

Tableau 32: Facteurs associés à l'intervalle QTc dans le modèle de régression linéaire.

Variable	All patients (n=82)	Patient HIV- (n=71)
	p	p
Age	0,111	0,303
Sexe	0,122	0,149
Nombre de copies de l'allèle 897Lys de KCNH2	<0,001	0,007
Statut VIH+	0,013	Non applicable
Dose quotidienne de méthadone (mg/jour)	0,020	0,720

II.4.4- DISCUSSION

II.4.4.1- Prévalence de l'allongement du QTc et facteurs de risques cliniques

Dans la cohorte de patients suivis à l'Hôpital Fernand Widal, 21% des patients substitués par la méthadone présentaient un QTc supérieur à la normale avec une dose moyenne quotidienne de 62 mg / jour.

La dose quotidienne moyenne prescrite en France varie entre 60 et 120 mg par jour (Vazquez 2006, Vorspan, Communication personnelle), globalement plus faible que celle prescrite dans les pays anglo-saxons. Une étude récente réalisée dans une cohorte française de 42 patients traités par une dose quotidienne de méthadone comparable (moyenne de 53 mg \pm 31) montre une prévalence de 10% d'allongement du QTc (QTc moyen = 414,3 \pm 28,5 ms ; Perrin-Terrin 2011).

La majorité des cas publiés d'arythmies et de Tdp sous méthadone ont été associées à de fortes doses (De Bels 2003, Krantz 2002, Butler 2011). Une étude récente a cependant montré chez des patients chinois traités par méthadone à faibles doses (dose médiane journalière de 40 mg/jour), une augmentation du QTc sous traitement chez les hommes (augmentation du QTc de 418,5 to 426,9 ms après 6 mois de traitement par la méthadone ; Chang 2011). Aucune différence en fonction du sexe n'a été notée dans notre étude.

Dans notre étude, la longueur du QTc n'est pas significativement associée à la dose de méthadone, ce qui est en accord avec cette étude récente. Cette absence d'association à la dose de méthadone suggère que d'autres facteurs cliniques et/ou génétiques sont associés à l'allongement du QTc.

Les patients VIH+ présentent des anomalies de l'ECG, en particulier des allongements du QT qui peuvent être à l'origine de problèmes cardiaques (Kocheril 1997, Nordin 2006, Reinsch 2009, Soliman 2010). Les patients VIH+ peuvent présenter des perturbations hydro-électrolytiques (notamment hypocalcémie, hypokaliémie et hypomagnésémie) associées à leur état de malnutrition, mais également des insuffisances hépatiques dues à leur co-infection par le VHC et pouvaient même développer des cardiomyopathies induites par le VIH (Justo 2006, Petrosillo 2006).

Une étude récente conduite sur des cellules HEK293 exprimant les canaux hERG a montré que la protéine Tat du VIH (pour : *transactivator of transcription*, un activateur puissant de la transcription

en ARN messenger et en ARN viral) inhibe les courants potassiques via une inhibition dose-dépendante de l'expression protéique des canaux hERG (Bai 2011). Cette équipe chinoise avait également montré qu'une injection de la protéine Tat induit un allongement du QTc dans un modèle animal (Bai 2011).

Ces patients consomment fréquemment des médicaments inhibant le métabolisme de la méthadone (Justo 2006). Dans notre population de patients infectés par le VIH (n=11), 9 étaient traités par des antiprotéases (82%). Anson et al. (2005) ont démontré sur un modèle cellulaire la capacité des inhibiteurs des protéases (notamment lopinavir, nelfinavir, ritonavir, et saquinavir), utilisés dans le traitement du VIH, à bloquer le canal potassique hERG de façon dose-dépendante. Une revue récente de la bibliographie évaluant l'impact des inhibiteurs des protéases sur le risque d'allongement de QT chez les patients VIH+ a conclu que ces molécules prédisposent à l'allongement de QT de façon indépendante en présence d'autres facteurs de risques (âge, sexe féminin, maladies cardiaques, diabète sucré et co-traitement par des médicaments allongeant l'intervalle QT, notamment la méthadone, Hunt 2011).

Notre analyse a montré une corrélation entre le statut VIH, les posologies de méthadone et l'allongement du QTc. Les patients VIH+ inclus recevaient des doses significativement plus importantes de méthadone et avaient des valeurs de QTc plus importantes.

Cependant, notre cohorte comprend majoritairement des patients VIH négatifs, pour lesquels d'autres facteurs de risques doivent être recherchés.

II.4.4.2- Rôle de KCNH2 dans l'allongement du QTc sous méthadone

Cette étude nous a permis d'impliquer pour la première fois un polymorphisme de *KCNH2* (c.2690A>C) comme étant un facteur de risque de l'allongement du QT sous méthadone. L'ouverture des canaux potassiques, dont hERG codé par *KCNH2*, entraîne un efflux de potassium qui correspond à la phase de repolarisation cardiaque. L'allongement du QTc est dû à un retard de la repolarisation cardiaque lié une sortie insuffisante ou ralentie des ions K⁺. Ce polymorphisme qui touche l'acide aminé 897 de hERG introduit une thréonine (allèle C) à la place d'une lysine (allèle A) (p.Lys987Thr). Les patients porteurs d'au moins un allèle 897Lys ont un QTc significativement allongé par rapport aux patients homozygotes pour l'allèle 897Thr. Cette association avait été

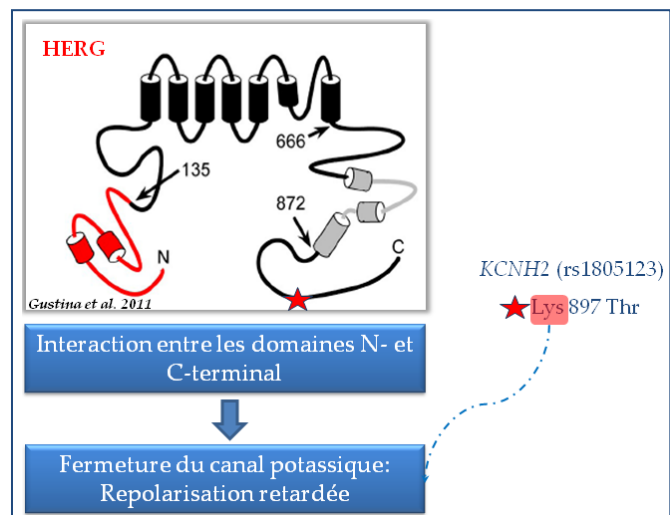
observée chez des volontaires sains (Gouas 2005) mais jamais chez des patients sous méthadone, et jamais de façon aussi marquée. En effet, une étude de Newton-Cheh et al. réalisée sur 1730 sujets de la cohorte de Framingham a montré que les patients homozygote ou hétérozygote pour l'allèle Lys897 présentait un allongement du QT de 3,9 ms (rapporté à l'âge, au sexe et la fréquence cardiaque) par rapport aux homozygotes 897Thr (Newton-Cheh 2007, confirmé par Marjamaa et al (2009)), *versus* 15 ms pour un allèle 897Lys dans notre étude (13 ms étant observés chez les patients VIH-).

Une étude *in vitro*, conduite sur des cellules humaines transfectées (cellules HEK293 surexprimant les canaux hERG), a montré que la méthadone bloque les canaux potassiques cardiaques codés par *KCNH2* (Katchman 2002), entraînant un retard de la repolarisation du cœur. Les auteurs ont également montré que la méthadone bloque l'efflux de potassium essentiellement lorsque le canal est ouvert et que seulement 10% des canaux sont bloqués en position fermée (figure 32, Katchman 2002). Une autre étude a montré que la (S)-méthadone bloque 3,5 fois plus le canal hERG que la (R)-Méthadone (Eap 2007).

L'interaction moléculaire directe ou indirecte qui existe entre la méthadone et ce canal potassique, reste à déterminer. Les canaux potassiques sont des canaux constitués de quatre chaînes polypeptidiques (Durdagi 2010).

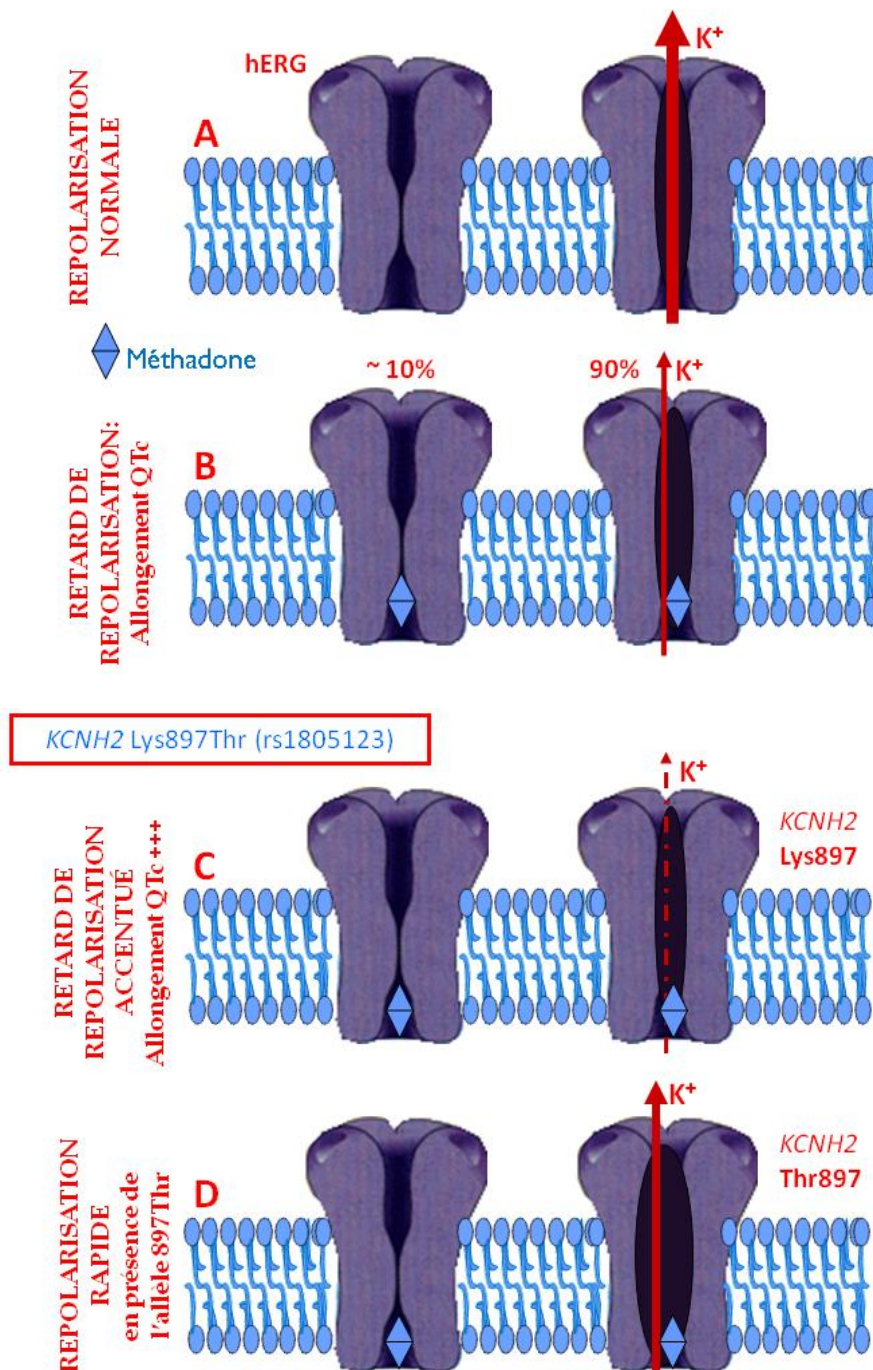
Figure 31: Interaction entre les domaines C- et N-terminaux du canal potassique hERG.

Chez les patients présentant une **Lysine** en position nucléotidique 897, le canal hERG pourrait rester à l'état fermé plus longtemps ce qui réduirait le flux de potassium et retarderait la repolarisation cardiaque.



Gustina et al. ont montré, à la suite de délétions des domaines N-et C-terminaux, que la fermeture du canal potassique hERG, induisant la fin de la repolarisation, est liée à l'interaction de ces régions (Gustina 2011). Des SNPs situés dans ces domaines seraient donc susceptibles de moduler ces interactions. Chez les patients porteurs de l'allèle 897Lys de *KCNH2*, les canaux potassiques hERG pourraient **présenter un retard à l'ouverture** du canal, entraînant un flux plus faible de potassium

et une repolarisation moins rapide majorée sous méthadone du fait d'une interaction particulière de la molécule avec $HERG^{Lys897}$ (figure 33). Inversement, les patients homozygotes $HERG^{897Thr}$ présentent un efflux de potassium peu ou pas modifié sous méthadone, conférant à ce génotype un caractère protecteur vis-à-vis du risque d'allongement du QT sous traitement (figure 33).



A- En l'absence de méthadone, l'ouverture du canal hERG et l'efflux des ions K⁺ entraîne la repolarisation cardiaque.

B- En présence de méthadone, le canal potassique est bloqué ce qui induit un faible efflux du K⁺ à l'extérieur des cardiomyocytes se traduisant par un retard de la repolarisation cardiaque

C- L'allèle Lys897 entraînerait une repolarisation retardée plus nettement que celle observée en (B), ce qui constituerait un facteur de risque vis-à-vis de l'allongement du QTc induit par la méthadone.

D- L'allèle minoritaire Thr897, par contre, entraînerait une moins grande sensibilité au blocage par la méthadone, permettant une persistance de l'efflux de K⁺. Celui-ci permettrait une repolarisation plus rapide qu'en (B) et donc un effet protecteur vis-à-vis de l'allongement du QTc sous traitement de substitution.

Figure 32 : Hypothèse de l'effet du SNP p.Lys897Thr de KCNH2 sur le canal potassique hERG en présence de méthadone

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP p.Lys897Thr de *KCNH2* varient significativement selon les ethnies, l'allèle 897Lys est prédominant dans les populations asiatiques et d'Afrique subsaharienne par rapport aux populations européennes (Tableau 31). Ceci implique que les patients d'origine asiatique ou africaine majoritairement homozygotes 897Lys seraient plus à risque de développer des allongements du QTc sous méthadone et nécessiteraient d'emblée un suivi cardiologique accru sous traitement.

Tableau 33 : Fréquences alléliques et génotypiques du SNP p.Lys897Thr dans différentes populations; comparaison à nos résultats.

Population concernée	Origine ethnique	Nombre de patients	<i>KCNH2</i> rs1805123 p.Lys897Thr A/C					
			Fréquences génotypiques			Fréquences alléliques		p^1
			AA	AC	CC	A	C	
Notre population	France	82	43,9	43,9	12,2	.659	.341	-
HapMap-CEU	Europe	113	57,5	37,2	5,3	.76,1	.239	$p=0,14$
HapMap-HCB	Asie (chine)	43	95,3	4,7	-	.977	.023	$p<0,0001$
HapMap-JPT	Asie (Japon)	86	95,3	4,7	-	.977	.023	$p<0,0001$
HapMap-YRI	Afrique sub-saharienne	59	96,6	3,4	-	.983	0.017	$p<0,0001$

¹ Les valeurs de p sont obtenues suite au test de χ^2 entre le nombre d'allèles A et C dans chaque groupe ethnique.

II.4.5- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de notre étude était d'identifier des facteurs de risque d'arythmie paroxystique majeure sous traitement par la méthadone, objectivé par l'allongement du QTc.

Dans la population de patients que nous avons analysée, un modèle de régression linéaire montre que **la durée du QTc est associée à un SNP du gène *KCNH2* (p.Lys897Thr) codant un canal potassique cardiaque**. Les patients porteurs d'au moins un allèle 897Lys de *KCNH2* ont un QTc significativement allongé par rapport aux patients homozygotes pour l'allèle Thr. Ce premier facteur de risque d'allongement du QTc sous méthadone doit être évalué sur de plus larges populations de patients. L'identification de ce marqueur pourrait constituer le premier pas vers la mise en place d'une prescription personnalisée de la méthadone.

Le polymorphisme Lys897Thr de *KCNH2* représente 10 % de la variance du QTc ; d'autres facteurs cliniques ou génétiques, tels que ceux impliqués dans le métabolisme de la méthadone doivent donc intervenir dans l'allongement du QTc et restent à identifier. Les SNPs d'*ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP2D6* et *CYP2B6* qui pourraient modifier la biodisponibilité de la méthadone au niveau cardiaque seraient particulièrement intéressants à évaluer. En effet, une étude a posé l'hypothèse d'un efflux variable de la méthadone par la P-gp également au niveau de la barrière sang-cœur. Les concentrations intracardiaques de romidepsine, un substrat connu de la P-gp allongeant le QT, y sont en effet plus importantes chez les souris inactivées pour *ABCB1* et entraînent des changements significatifs du QT (Sissung 2011).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux que j'ai réalisés lors de ma thèse s'intègrent à la fois dans la thématique de l'équipe *Variabilité de la réponse des toxicomanes aux traitements de substitution* (Direction : Pr Lepine) de l'UMR8206, INSERMU705 à Paris et dans celle du Département de Pharmacologie clinique et expérimentale de l'Université Saint-Joseph Beyrouth (Direction: Pr Khabbaz).

Une part importante de mon travail de thèse a été consacrée à la mise en place de techniques de génotypage spécifique au niveau des deux laboratoires d'accueil, à la prise en charge de projets en cours mais également, pour le volet réalisé à Beyrouth, à la mise en place de nouveaux projets.

Dans le cadre de ces travaux de recherche clinique, j'ai été amenée à interagir avec des cliniciens de différentes spécialités, en addictologie (Dr Vorspan, Pr Lepine), médecine interne (Dr Lloret-Linares, Pr Mouly), anesthésie (Dr Naccache, Dr Jabbour et Pr Yazbeck), qui ont tous comme point commun de prescrire dans leur pratique quotidienne, des opiacés, et de se heurter à la variabilité de la réponse et à la iatrogénie de ces molécules.

Les opioïdes occupent actuellement une place primordiale dans l'arsenal thérapeutique. La morphine reste la molécule la plus efficace pour le traitement des douleurs aiguës postopératoires et chroniques, notamment cancéreuses. La méthadone constitue quant à elle une des molécules de choix dans le traitement substitutif à l'héroïne. Il existe **une grande variabilité inter-individuelle de la réponse à la douleur et au traitement de substitution ainsi que des doses**, permettant une analgésie efficace ou un équilibre thérapeutique (Crettol 2008.a ; Fonseca 2011).

Les travaux présentés dans ce manuscrit confirment cette grande variabilité et explorent l'hypothèse du rôle éventuel de variants génétiques impliqués dans la réponse aux opioïdes et dans la survenue d'effets indésirables sous traitement. Bien qu'il soit prématuré d'imaginer les répercussions de la pharmacogénétique des opioïdes sur la pratique quotidienne dans la prise en charge de la douleur et des patients toxicomanes substitués par la méthadone, ces travaux ouvrent plusieurs champs d'investigation :

Quels sont les facteurs génétiques modulant la réponse à la morphine en postopératoire ?

Dans le travail que j'ai initié sur des patients libanais, le SNP c.3435C>T d'*ABCB1* était significativement associé aux doses de morphine et aux effets nauséeux. *ABCB1* est un gène candidat dans l'amélioration de la prise en charge des patients douloureux en postopératoire. L'analyse va se poursuivre afin de confirmer ces résultats sur 100 patients. Un autre projet d'étude des facteurs génétiques de variabilité de la réponse à la morphine vient d'être initié chez des patients cancéreux traités de manière chronique par la morphine (Service d'hématologie de l'hôtel dieu de France à Beyrouth, Pr Chahine). Il sera intéressant d'évaluer si l'influence de ces marqueurs varie en fonction du protocole de traitement (traitement aigu ou chronique de morphine).

Comment adapter la prescription de la morphine chez les patients obèses ?

Nous avons établi les fréquences alléliques de variants impliqués dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la morphine chez des patients présentant une obésité morbide. Nous avons ainsi montré que l'allèle 118G d'*OPRM1* était plus fréquent chez ces patients.

Il serait à présent intéressant de corréler ces résultats à la variabilité de leur réponse à la morphine, et de rechercher dans un second temps l'impact de la chirurgie bariatrique sur la pharmacocinétique de la morphine, afin d'établir une base rationnelle et personnalisée de prescription chez ces patients.

Comment adapter a priori la prescription de méthadone chez des patients toxicomanes ?

Nos résultats ne montrent pas d'association étroite entre les polymorphismes des gènes sélectionnés et la réponse au traitement. Aucune association n'a été retrouvée entre les SNPs étudiés et les doses maximales ou actuelles de méthadone, ni avec les concentrations plasmatiques rapportées aux doses.

Dans notre étude, trois facteurs sont associés à l'expression phénotypique de l'activité CYP3A par le test au midazolam : la prise de BZD, l'infection par le VIH et un polymorphisme du *POR*.

Comment limiter le risque de Tdp sous méthadone ?

Le travail mené sur les effets secondaires cardiaques de la méthadone a permis de mettre en évidence pour la première fois un facteur génétique significativement associé à l'allongement du QTc : le polymorphisme p.Lys897Thr du gène *KCNH2*. L'application clinique de ces résultats pourrait être, après confirmation de l'implication de l'allèle 897Lys de *KCNH2* dans une seconde cohorte indépendante, la mise en place d'un génotypage prospectif de ce SNP pour les patients entrant dans un programme de substitution aux opiacés par la méthadone. Un renforcement de la surveillance électro-cardiographique devra être mise en place en cas de mise en évidence de ces facteurs de risque génétiques, particulièrement chez des patients VIH+, cumulant plusieurs facteurs de risque d'allongement majeur du QTc. Une attention particulière peut d'ores et déjà être portée aux patients d'origine africaine ou asiatique. L'alternative thérapeutique serait alors soit de diminuer les doses de méthadone soit d'opter pour une substitution par la buprénorphine. Une autre alternative pourrait être l'utilisation de la forme racémique (R)- de la méthadone, actuellement disponible dans certains pays et apparemment dénuée d'effets secondaires cardiaques (Ansermot 2010).

Des études cellulaires et de modélisation moléculaire permettraient de comprendre l'impact sur le fonctionnement du canal hERG de l'acide aminé 897, en présence de la méthadone.

Ce travail est le premier à ouvrir des perspectives en vue d'une prise en charge personnalisée de la méthadone.

La morphine et la méthadone gardent une place majeure en thérapeutique et, comme pour tout autre médicament, la préoccupation d'améliorer leur profil efficacité/toxicité est constante. Une voie d'optimisation est la personnalisation du traitement en fonction des caractéristiques génétiques du patient, qui peuvent intervenir sur l'efficacité et la toxicité de la molécule, de son absorption à son élimination en passant par son action pharmacologique.

Centrées sur la morphine et la méthadone, notre travail a pris comme hypothèse que des facteurs génétiques modulaient la réponse au traitement. Nous avons choisi de considérer plusieurs grandes variables phénotypiques de façon à explorer cette hypothèse dans des populations distinctes (toxicomanes, patients en postopératoire, obèses), par des approches génétiques ciblées ou par criblage plus large, et en considérant soit la réponse au traitement soit les effets indésirables.

Les études réalisées dans le cadre de ce travail, ainsi que celles publiées dans ce domaine jusqu'à présent, montrent une participation modeste des facteurs génétiques à la variabilité de la réponse du patient au traitement par les opiacés et opioïdes, mais pointent un certain nombre d'interrogations méthodologiques.

La difficulté de relier la variabilité de réponse à un médicament au terrain génétique réside en grande partie dans l'hétérogénéité des patients que distinguent entre eux, par exemple, les co-administrations de molécules et/ou les co-morbidités, et ce malgré tous les efforts de rigueur mis en œuvre dans leur recrutement. Cette hétérogénéité est marquée (i) chez les patients toxicomanes, en raison notamment du caractère dissimulé, car illégal, de certaines de leurs pratiques de consommation, associé à un degré variable de compliance au traitement et (ii) en psychiatrie, discipline dans laquelle la caractérisation phénotypique est plus récente que dans d'autres disciplines.

En outre, il existe un grand nombre de facteurs environnementaux et alimentaires non maîtrisés, dont le rôle sur l'activité des cytochromes P450, par exemple, est susceptible de modifier la réponse au traitement.

La stratégie « gènes candidats » peut ne pas être concluante lorsque le choix des gènes, dicté par un rationnel bibliographique documenté, mais par définition borné à ce qui est bien connu, le

circuit de récompense par exemple, cible des objectifs qui sont en réalité peu concernés dans le phénomène physiopathologique complexe étudié. Un criblage de gènes sans *a priori* peut sembler plus apte à mettre en évidence un ou plusieurs gènes dont la responsabilité était insoupçonnée jusqu'à présent d'après les seules données de la littérature, à condition d'être appliqué à un effectif suffisamment homogène et numériquement important.

Il est cependant des situations où la stratégie « gène candidat » est contributive lorsque le trait étudié est parfaitement défini, quantifiable et sujet à des variations dont les causes sont connues et repérables dans la population examinée.

Nous avons pu par cette voie identifier le gène *KCNH2* comme étant associé à l'allongement de l'espace QT, un effet indésirable cardiaque de la méthadone. Ce résultat, sous réserve de sa réplication dans une seconde cohorte indépendante, offrirait la perspective de faire bénéficier des patients à risque d'arythmie cardiaque d'une prise en charge clinique renforcée.

Si ce résultat paraît le plus contributif de notre point de vue, il existe d'autres pistes encourageantes méritant d'être poursuivies. Par exemple, l'hypothèse du rôle d'*ABCB1* dans l'analgésie morphinique et ses effets secondaires doit être approfondie pour conduire à une conclusion non ambiguë, avant d'envisager une application pharmacogénétique comme le souhaiterait les anesthésistes.

Enfin, dans une zone frontière originale située entre la physiopathologie et la pharmacogénétique, notre observation d'une fréquence plus élevée de l'allèle 118G d'*OPRM1* dans la population de sujets obèses algiques ajoute un élément en faveur de la participation du système opioïde à l'obésité morbide et pose des questions sur les conséquences de cette particularité sur la réponse à la morphine de ces patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aasmundstad TA, Storset P. Influence of ranitidine on the morphine-3-glucuronide to morphine-6-glucuronide ratio after oral administration of morphine in humans. *Hum Exp Toxicol*. 1998;17(6):347-52.

Abdi H, Holm's Sequential Bonferroni Procedure. *Encyclopedia of Research Design*. 2010.

Abramson FP. Methadone plasma protein binding: alterations in cancer and displacement from alpha 1-acid glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*. 1982;32(5):652-8.

Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*. 1994;636(1):126-30.

Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(10):611-8.

Ansermot N, Albayrak O, Schlapfer J, Crettol S, Croquette-Krokar M, Bourquin M, et al. Substitution of (R,S)-methadone by (R)-methadone: Impact on QTc interval. *Arch Intern Med*. 2010;170(6):529-36.

Anson BD, Weaver JG, Ackerman MJ, Akinsete O, Henry K, January CT, et al. Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):682-6.

Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg*. 2003;97(2):534-40, table of contents.

Astals M, Diaz L, Domingo-Salvany A, Martin-Santos R, Bulbena A, Torrens M. Impact of co-occurring psychiatric disorders on retention in a methadone maintenance program: an 18-month follow-up study. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6(11):2822-32.

Bai YL, Liu HB, Sun B, Zhang Y, Li Q, Hu CW, et al. HIV Tat protein inhibits hERG K⁺ channels: a potential mechanism of HIV infection induced LQTS. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(5):876-80.

Barratt DT, Collier JK, Somogyi AA. Association between the DRD2 A1 allele and response to methadone and buprenorphine maintenance treatments. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(4):323-31.

Bart G, Kreek MJ, Ott J, LaForge KS, Proudnikov D, Pollak L, et al. Increased attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with alcohol dependence in central Sweden. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(2):417-22.

Beaune PH. [Pharmacogenetics: from basic research to clinical applications]. *Ann Pharm Fr*. 2007 Nov;65(6):365-70.

Befort K, Filliol D, Decaillot FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL. A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3130-7.

Begre S, von Bardeleben U, Ladewig D, Jaquet-Rochat S, Cosendai-Savary L, Golay KP, et al. Paroxetine increases steady-state concentrations of (R)-methadone in CYP2D6 extensive but not poor metabolizers. *J Clin Psychopharmacol*. 2002;22(2):211-5.

- Bell J, Burrell T, Indig D, Gilmour S. Cycling in and out of treatment; participation in methadone treatment in NSW, 1990-2002. *Drug Alcohol Depend.* 2006;81(1):55-61.
- Bending MR, Skacel PO. Rifampicin and methadone withdrawal. *Lancet.* 1977;1(8023):1211.
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician.* 2008;11(2 Suppl):S105-20.
- Beyer A, Koch T, Schroder H, Schulz S, Holtt V. Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor. *J Neurochem.* 2004;89(3):553-60.
- Bhargava HN, Rahmani NH, Villar VM, Larsen AK. Effects of naltrexone on pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously administered morphine in the rat. *Pharmacology.* 1993;46(2):66-74.
- Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, et al. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics.* 2000;10(8):679-85.
- Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9608-13.
- Borg L, Ho A, Peters JE, Kreek MJ. Availability of reliable serum methadone determination for management of symptomatic patients. *J Addict Dis.* 1995;14(3):83-96.
- Bouer R, Barthe L, Philibert C, Tournaire C, Woodley J, Houin G. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999;13(4):494-500.
- Boulton DW, Arnaud P, DeVane CL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone enantiomers after a single oral dose of racemate. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(1):48-57.
- Bourasset F, Cisternino S, Temsamani J, Scherrmann JM. Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 2003;86(6):1564-7.
- Burke RE. Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain.* 2007;130(Pt 4):887-94.
- Butler B, Rubin G, Lawrance A, Batey R, Bell J. Estimating the risk of fatal arrhythmia in patients in methadone maintenance treatment for heroin addiction. *Drug Alcohol Rev.* 2011;30(2):173-80.
- Cadet P. Mu opiate receptor subtypes. *Med Sci Monit.* 2004;10(6):MS28-32.
- Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R. Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(4):559-66.
- Chang KC, Huang CL, Liang HY, Chang SS, Wang YC, Liang WM, et al. Gender-Specific Differences in Susceptibility to Low-Dose Methadone-Associated QTc Prolongation in Patients with Heroin Dependence. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2011 Dec 2.
- Cherny NI. The pharmacological management of cancer pain. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 7:S265-78.

- Chevillard L, Megarbane B, Baud FJ, Risede P, Decleves X, Mager D, et al. Mechanisms of respiratory insufficiency induced by methadone overdose in rats. *Addict Biol*. 2010;15(1):62-80.
- Chou WY, Wang CH, Liu PH, Liu CC, Tseng CC, Jawan B. Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy. *Anesthesiology*. 2006;[a](#);105(2):334-7.
- Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, et al. Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;[b](#);50(7):787-92.
- Christrup LL. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997;41(1 Pt 2):116-22.
- Coller JK, Barratt DT, Dahlen K, Loennechen MH, Somogyi AA. ABCB1 genetic variability and methadone dosage requirements in opioid-dependent individuals. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(6):682-90.
- Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(2):121-39.
- Coller JK, Joergensen C, Foster DJ, James H, Gillis D, Christrup L, et al. Lack of influence of CYP2D6 genotype on the clearance of (R)-, (S)- and racemic-methadone. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2007;45(7):410-7.
- Colson J, Koyyalagunta D, Falco FJ, Manchikanti L. A systematic review of observational studies on the effectiveness of opioid therapy for cancer pain. *Pain Physician*. 2011;14(2):E85-102.
- Compton P, Geschwind DH, Alarcon M. Association between human mu-opioid receptor gene polymorphism, pain tolerance, and opioid addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;121B(1):76-82.
- Coulbault L, Beaussier M, Verstuyft C, Weickmans H, Dubert L, Tregouet D, et al. Environmental and genetic factors associated with morphine response in the postoperative period. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(4):316-24.
- Court MH. Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metab Rev*. 2010;42(1):209-24.
- Crettol S, Deglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Gothuey I, et al. ABCB1 and cytochrome P450 genotypes and phenotypes: influence on methadone plasma levels and response to treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(6):668-81.
- Crettol S, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Gothuey I, Monnat M, et al. Association of dopamine and opioid receptor genetic polymorphisms with response to methadone maintenance treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;[a](#);32(7):1722-7.
- Crettol S, Deglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Gothuey I, et al. No influence of ABCB1 haplotypes on methadone dosage requirement. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;[b](#);83(5):668-9; author reply 9-70.
- Crettol S, Deglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Gothuey I, Hammig R, et al. Methadone enantiomer plasma levels, CYP2B6, CYP2C19, and CYP2C9 genotypes, and response to treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(6):593-604.

Crettol S, Digon P, Golay KP, Brawand M, Eap CB. In vitro P-glycoprotein-mediated transport of (R)-, (S)-, (R,S)-methadone, LAAM and their main metabolites. *Pharmacology*. 2007;80(4):304-11.

Darbari DS, van Schaik RH, Capparelli EV, Rana S, McCarter R, van den Anker J. UGT2B7 promoter variant -840G>A contributes to the variability in hepatic clearance of morphine in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2008;83(3):200-2.

Davis AM, Inturrisi CE. d-Methadone blocks morphine tolerance and N-methyl-D-aspartate-induced hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(2):1048-53.

Davis CA, Levitan RD, Reid C, Carter JC, Kaplan AS, Patte KA, et al. Dopamine for "wanting" and opioids for "liking": a comparison of obese adults with and without binge eating. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(6):1220-5.

De Bels D, Staroukine M, Devriendt J. Torsades de pointes due to methadone. *Ann Intern Med*. 2003;139(2):E156.

Doehring A, Hentig N, Graff J, Salamat S, Schmidt M, Geisslinger G, et al. Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or function modulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(6):407-14.

Dreborg S, Sundstrom G, Larsson TA, Larhammar D. Evolution of vertebrate opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15487-92.

Drewe J, Ball HA, Beglinger C, Peng B, Kemmler A, Schachinger H, et al. Effect of P-glycoprotein modulation on the clinical pharmacokinetics and adverse effects of morphine. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(3):237-46.

Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*. 2003;12(3):205-16.

Durdagi S, Subbotina J, Lees-Miller J, Guo J, Duff HJ, Noskov SY. Insights into the molecular mechanism of hERG1 channel activation and blockade by drugs. *Curr Med Chem*. 2010;17(30):3514-32.

Dykstra LA, Fischer BD, Balter RE, Henry FE, Schmidt KT, Miller LL. Opioid antinociception, tolerance and dependence: interactions with the N-methyl-D-aspartate system in mice. *Behav Pharmacol*. 2011;22(5-6):540-7.

Eap CB, Bertschy G, Powell K, Baumann P. Fluvoxamine and fluoxetine do not interact in the same way with the metabolism of the enantiomers of methadone. *J Clin Psychopharmacol*. 1997;17(2):113-7.

Eap CB, Broly F, Mino A, Hammig R, Deglon JJ, Uehlinger C, et al. Cytochrome P450 2D6 genotype and methadone steady-state concentrations. *J Clin Psychopharmacol*. 2001;21(2):229-34.

Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(14):1153-93.

Eap CB, Crettol S, Rougier JS, Schlapfer J, Sintra Grilo L, Deglon JJ, et al. Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(5):719-28.

Eap CB, Finkbeiner T, Gastpar M, Scherbaum N, Powell K, Baumann P. Replacement of (R)-methadone by a double dose of (R,S)-methadone in addicts: interindividual variability of the (R)/(S) ratios and evidence of adaptive changes in methadone pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996;50(5):385-9.

Ehret GB, Voide C, Gex-Fabry M, Chabert J, Shah D, Broers B, et al. Drug-induced long QT syndrome in injection drug users receiving methadone: high frequency in hospitalized patients and risk factors. *Arch Intern Med.* 2006;166(12):1280-7.

Elkader AK, Brands B, Dunn E, Selby P, Sproule BA. Major depressive disorder and patient satisfaction in relation to methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics in stabilized methadone maintenance patients. *J Clin Psychopharmacol.* 2009;29(1):77-81.

Etches RC, Warriner CB, Badner N, Buckley DN, Beattie WS, Chan VW, et al. Continuous intravenous administration of ketorolac reduces pain and morphine consumption after total hip or knee arthroplasty. *Anesth Analg.* 1995;81(6):1175-80.

Fanoë S, Hvidt C, Ege P, Jensen GB. Syncope and QT prolongation among patients treated with methadone for heroin dependence in the city of Copenhagen. *Heart.* 2007;93(9):1051-5.

Ferner RE. Did the drug cause death? Codeine and breastfeeding. *Lancet.* 2008;372(9639):606-8.

Ferrari A, Coccia CP, Bertolini A, Sternieri E. Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res.* 2004;50(6):551-9.

Filbey FM, Ray L, Smolen A, Claus ED, Audette A, Hutchison KE. Differential neural response to alcohol priming and alcohol taste cues is associated with DRD4 VNTR and OPRM1 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(7):1113-23.

Fischer BD, Ward SJ, Henry FE, Dykstra LA. Attenuation of morphine antinociceptive tolerance by a CB(1) receptor agonist and an NMDA receptor antagonist: Interactive effects. *Neuropharmacology.* 2010;58(2):544-50.

Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL, Jr., Bhat K, et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics.* 2003;13(10):595-606.

Fonseca F, de la Torre R, Diaz L, Pastor A, Cuyas E, Pizarro N, et al. Contribution of Cytochrome P450 and ABCB1 Genetic Variability on Methadone Pharmacokinetics, Dose Requirements, and Response. *PLoS One.* 2011;6(5):e19527.

Foster DJ, Somogyi AA, Bochner F. Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47(4):403-12.

Foster DJ, Somogyi AA, Dyer KR, White JM, Bochner F. Steady-state pharmacokinetics of (R)- and (S)-methadone in methadone maintenance patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50(5):427-40.

Frasco PE, Sprung J, Trentman TL. The impact of the joint commission for accreditation of healthcare organizations pain initiative on perioperative opiate consumption and recovery room length of stay. *Anesth Analg.* 2005;100(1):162-8.

Fujita K, Ando Y, Yamamoto W, Miya T, Endo H, Sunakawa Y, et al. Association of UGT2B7 and ABCB1 genotypes with morphine-induced adverse drug reactions in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;65(2):251-8.

Garrido E, Palomo T, Ponce G, Garcia-Consuegra I, Jimenez-Arriero MA, Hoenicka J. The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. *Neurotox Res.* 2011;20(1):32-9.

Geletko SM, Erickson AD. Decreased methadone effect after ritonavir initiation. *Pharmacotherapy.* 2000;20(1):93-4.

Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J. Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality.* 2004;16(1):36-44.

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):215-36.

Gil M, Sala M, Anguera I, Chapinal O, Cervantes M, Guma JR, et al. QT prolongation and Torsades de Pointes in patients infected with human immunodeficiency virus and treated with methadone. *Am J Cardiol.* 2003;92(8):995-7.

Goldenberg I, Moss AJ. Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(24):2291-300.

Goldstein MF, Deren S, Kang SY, Des Jarlais DC, Magura S. Evaluation of an alternative program for MMTP drop-outs: impact on treatment re-entry. *Drug Alcohol Depend.* 2002;66(2):181-7.

Goodman L, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Twelfth ed. New York McGraw-Hill Medical; 2011.

Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, et al. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(11):1213-22.

Grace D, Fee JP. A comparison of intrathecal morphine-6-glucuronide and intrathecal morphine sulfate as analgesics for total hip replacement. *Anesth Analg.* 1996;83(5):1055-9.

Grass JA, Sakima NT, Valley M, Fischer K, Jackson C, Walsh P, et al. Assessment of ketorolac as an adjuvant to fentanyl patient-controlled epidural analgesia after radical retropubic prostatectomy. *Anesthesiology.* 1993;78(4):642-8; discussion 21A.

Grosch S, Niederberger E, Lotsch J, Skarke C, Geisslinger G. A rapid screening method for a single nucleotide polymorphism (SNP) in the human MOR gene. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52(6):711-4.

Gustina AS, Trudeau MC. hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal region interactions. *J Gen Physiol.* 2011;137(3):315-25.

Hallinan R, Crettol S, Agho K, Attia J, Besson J, Croquette-Krokar M, et al. Cannabis and benzodiazepines as determinants of methadone trough plasma concentration variability in maintenance treatment: a transnational study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(11):1113-20.

Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, Hall SD. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):114-21.

Hasegawa Y, Kishimoto S, Takahashi H, Inotsume N, Takeuchi Y, Fukushima S. Altered expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver affects the disposition of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of cholestasis. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(9):1205-10.

- Hasselstrom J, Eriksson S, Persson A, Rane A, Svensson JO, Sawe J. The metabolism and bioavailability of morphine in patients with severe liver cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol*. 1990;29(3):289-97.
- Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, Katoh R, Tagami M, Ide S, et al. Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with OPRM1 gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1605-16.
- Heelon MW, Meade LB. Methadone withdrawal when starting an antiretroviral regimen including nevirapine. *Pharmacotherapy*. 1999;19(4):471-2.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John E, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3473-8.
- Holmes VF. Rifampin-induced methadone withdrawal in AIDS. *J Clin Psychopharmacol*. 1990;10(6):443-4.
- Holthe M, Klepstad P, Zahlén K, Borchgrevink PC, Hagen L, Dale O, et al. Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the UGT2B7 H268Y and UGT1A1*28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002;58(5):353-6.
- Holthe M, Rakvag TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, et al. Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(1):17-26.
- Horowitz R, Kotler M, Shufman E, Aharoni S, Kremer I, Cohen H, et al. Confirmation of an excess of the high enzyme activity COMT val allele in heroin addicts in a family-based haplotype relative risk study. *Am J Med Genet*. 2000;96(5):599-603.
- Hser YI, Hoffman V, Grella CE, Anglin MD. A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58(5):503-8.
- Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1733-8.
- Huehne K, Leis S, Muenster T, Wehrfritz A, Winter S, Maihofner C, et al. High post surgical opioid requirements in Crohn's disease are not due to a general change in pain sensitivity. *Eur J Pain*. 2009;13(10):1036-42.
- Hunt K, Hughes CA, Hills-Niemenen C. Protease inhibitor-associated QT interval prolongation. *Ann Pharmacother*. 2011;45(12):1544-50.
- Huwylar J, Drewe J, Gutmann H, Thole M, Fricker G. Modulation of morphine-6-glucuronide penetration into the brain by P-glycoprotein. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998;36(2):69-70.
- Huwylar J, Drewe J, Klusemann C, Fricker G. Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. *Br J Pharmacol*. 1996;118(8):1879-85.
- Inturrisi CE, Colburn WA, Kaiko RF, Houde RW, Foley KM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;41(4):392-401.

Iribarne C, Berthou F, Baird S, Dreano Y, Picart D, Bail JP, et al. Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(2):365-73.

Jasmin L, Narasaiah M, Tien D. Noradrenaline is necessary for the hedonic properties of addictive drugs. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(4):243-50.

Jetter A, Fatkenheuer G, Frank D, Klaassen T, Seeringer A, Doroshenko O, et al. Do activities of cytochrome P450 (CYP)3A, CYP2D6 and P-glycoprotein differ between healthy volunteers and HIV-infected patients? *Antivir Ther*. 2010;15(7):975-83.

Johnson RE, Chutuape MA, Strain EC, Walsh SL, Stitzer ML, Bigelow GE. A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine, and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med*. 2000;343(18):1290-7.

Johnston LD. Prescription drug use by adolescents: what we are learning and what we still need to know. *J Adolesc Health*. 2009;45(6):539-40.

Judson RS, Salisbury BA, Reed CR, Ackerman MJ. Pharmacogenetic issues in thorough QT trials. *Mol Diagn Ther*. 2006;10(3):153-62.

Justo D, Gal-Oz A, Paran Y, Goldin Y, Zeltser D. Methadone-associated Torsades de Pointes (polymorphic ventricular tachycardia) in opioid-dependent patients. *Addiction*. 2006;101(9):1333-8.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 1993;57(4):1047-60.

Katchman AN, McGroary KA, Kilborn MJ, Kornick CA, Manfredi PL, Woosley RL, et al. Influence of opioid agonists on cardiac human ether-a-go-go-related gene K(+) currents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(2):688-94.

Katzung BG, Trevor AJ, Masters SB. *Basic and Clinical Pharmacology Eleventh ed*: McGraw-Hill Medical 2009.

Kehlet H, Dahl JB. The value of "multimodal" or "balanced analgesia" in postoperative pain treatment. *Anesth Analg*. 1993;77(5):1048-56.

Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, Sheffels P. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;74(6):543-54.

Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, Sheffels P. Role of hepatic and intestinal cytochrome P450 3A and 2B6 in the metabolism, disposition, and miotic effects of methadone. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76(3):250-69.

King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci*. 2001;4(3):268-74.

Klepstad P, Fladvad T, Skorpen F, Bjordal K, Caraceni A, Dale O, et al. Influence from genetic variability on opioid use for cancer pain: a European genetic association study of 2294 cancer pain patients. *Pain*. 2011;152(5):1139-45.

Klepstad P, Kaasa S, Cherny N, Hanks G, de Conno F. Pain and pain treatments in European palliative care units. A cross sectional survey from the European Association for Palliative Care Research Network. *Palliat Med*. 2005;19(6):477-84.

- Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, et al. The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(10):1232-9.
- Kocheril AG, Bokhari SA, Batsford WP, Sinusas AJ. Long QTc and torsades de pointes in human immunodeficiency virus disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1997;20(11):2810-6.
- Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder SJ. Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet*. 2006;368(9536):704.
- Krantz MJ, Lewkowicz L, Hays H, Woodroffe MA, Robertson AD, Mehler PS. Torsade de pointes associated with very-high-dose methadone. *Ann Intern Med*. 2002;137(6):501-4.
- Krantz MJ, Rowan SB, Mehler PS. Cocaine-related torsade de pointes in a methadone maintenance patient. *J Addict Dis*. 2005;24(1):53-60.
- Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA. Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev*. 2005;57(1):1-26.
- Kreek MJ, Borg L, Ducat E, Ray B. Pharmacotherapy in the treatment of addiction: methadone. *J Addict Dis*. 2010;29(2):200-16.
- Kristensen K, Christensen CB, Christrup LL. The mu1, mu2, delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sci*. 1995;56(2):PL45-50.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996;6(3):243-50.
- Lamba JK, Chen X, Lan LB, Kim JW, Wei Wang X, Relling MV, et al. Increased CYP3A4 copy number in TONG/HCC cells but not in DNA from other humans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(6):415-27.
- Lange RA, Hillis LD. Cardiovascular complications of cocaine use. *N Engl J Med*. 2001;345(5):351-8.
- Langlade A, Serrie A, Thurel C. *Le dictionnaire de la douleur*; 2001.
- Laugsand EA, Fladvad T, Skorpen F, Maltoni M, Kaasa S, Fayers P, et al. Clinical and genetic factors associated with nausea and vomiting in cancer patients receiving opioids. *Eur J Cancer*. 2011;47(11):1682-91.
- Lawford BR, Young RM, Noble EP, Sargent J, Rowell J, Shadforth S, et al. The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment. *Am J Med Genet*. 2000;96(5):592-8.
- Lawrence AJ, Michalkiewicz A, Morley JS, MacKinnon K, Billington D. Differential inhibition of hepatic morphine UDP-glucuronosyltransferases by metal ions. *Biochem Pharmacol*. 1992;43(11):2335-40.
- Le Marec T. *Etude des effets comportementaux induits par la morphine, la méthadone et la buprenorphine chez la souris : rôle des systèmes dopaminergiques et opioïdes*. Paris: Paris Descartes; 2010.
- Lepper ER, Baker SD, Permenter M, Ries N, van Schaik RH, Schenk PW, et al. Effect of common CYP3A4 and CYP3A5 variants on the pharmacokinetics of the cytochrome P450 3A phenotyping probe midazolam in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7398-404.

- Levrán O, O'Hara K, Peles E, Li D, Barral S, Ray B, et al. ABCB1 (MDR1) genetic variants are associated with methadone doses required for effective treatment of heroin dependence. *Hum Mol Genet*. 2008;17(14):2219-27.
- Lichtermann D, Franke P, Maier W, Rao ML. Pharmacogenomics and addiction to opiates. *Eur J Pharmacol*. 2000;410(2-3):269-79.
- Lin JH, Chiba M, Chen IW, Nishime JA, deLuna FA, Yamazaki M, et al. Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 3A [correction of P-450 A] and p-glycoprotein induction. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(10):1187-93.
- Lloret Linares C, Decleves X, Oppert JM, Basdevant A, Clement K, Bardin C, et al. Pharmacology of morphine in obese patients: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(10):635-51.
- Lotsch J, Schmidt R, Vetter G, Schmidt H, Niederberger E, Geisslinger G, et al. Increased CNS uptake and enhanced antinociception of morphine-6-glucuronide in rats after inhibition of P-glycoprotein. *J Neurochem*. 2002;**a**;83(2):241-8.
- Lotsch J, Zimmermann M, Darimont J, Marx C, Dudziak R, Skarke C, et al. Does the A118G polymorphism at the mu-opioid receptor gene protect against morphine-6-glucuronide toxicity? *Anesthesiology*. 2002;**b**;97(4):814-9.
- Lotsch J, Skarke C, Tegeder I, Geisslinger G. Drug interactions with patient-controlled analgesia. *Clin Pharmacokinet*. 2002;**c**;41(1):31-57.
- Lotsch J, Skarke C, Grosch S, Darimont J, Schmidt H, Geisslinger G. The polymorphism A118G of the human mu-opioid receptor gene decreases the pupil constrictory effect of morphine-6-glucuronide but not that of morphine. *Pharmacogenetics*. 2002;**d**;12(1):3-9.
- Lotsch J, Skarke C, Liefhold J, Geisslinger G. Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(14):983-1013.
- Lotsch J. Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage*. 2005;**a**;29(5 Suppl):S10-24.
- Lotsch J, Geisslinger G. Are mu-opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends Mol Med*. 2005;**b**;11(2):82-9.
- Lotsch J, Geisslinger G. Relevance of frequent mu-opioid receptor polymorphisms for opioid activity in healthy volunteers. *Pharmacogenomics J*. 2006;**a**;6(3):200-10.
- Lotsch J, Skarke C, Wieting J, Oertel BG, Schmidt H, Brockmoller J, et al. Modulation of the central nervous effects of levomethadone by genetic polymorphisms potentially affecting its metabolism, distribution, and drug action. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;**b**;79(1):72-89.
- Lotsch J, von Hentig N, Freynhagen R, Griessinger N, Zimmermann M, Doebering A, et al. Cross-sectional analysis of the influence of currently known pharmacogenetic modulators on opioid therapy in outpatient pain centers. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(6):429-36.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ullmanen I, Melen K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 1995;34(13):4202-10.
- Luna-Tortos C, Fedrowitz M, Loscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1364-75.

- Madadi P, Ciszkowski C, Gaedigk A, Leeder JS, Teitelbaum R, Chitayat D, et al. Genetic transmission of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) ultrarapid metabolism: implications for breastfeeding women taking codeine. *Curr Drug Saf*. 2011;6(1):36-9.
- Madadi P, Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder JS, et al. Safety of codeine during breastfeeding: fatal morphine poisoning in the breastfed neonate of a mother prescribed codeine. *Can Fam Physician*. 2007;53(1):33-5.
- Madadi P, Ross CJ, Hayden MR, Carleton BC, Gaedigk A, Leeder JS, et al. Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine during breastfeeding: a case-control study. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(1):31-5.
- Mague SD, Blendy JA. OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend*. 2010;108(3):172-82.
- Manchikanti L, Benyamin R, Datta S, Vallejo R, Smith H. Opioids in chronic noncancer pain. *Expert Rev Neurother*. 2010;10(5):775-89.
- Maremmanni I, Pacini M, Cesaroni C, Lovrecic M, Perugi G, Tagliamonte A. QTc interval prolongation in patients on long-term methadone maintenance therapy. *Eur Addict Res*. 2005;11(1):44-9.
- Marjamaa A, Newton-Cheh C, Porthan K, Reunanen A, Lahermo P, Vaananen H, et al. Common candidate gene variants are associated with QT interval duration in the general population. *J Intern Med*. 2009;265(4):448-58.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75(1):13-33.
- Mashayekhi SO, Sattari MR, Routledge PA. Evidence of active transport involvement in morphine transport via MDCKII and MDCK-PGP cell lines. *Res Pharm Sci*. 2010;5(2):99-106.
- Mayet S, Gossop M, Lintzeris N, Markides V, Strang J. Methadone maintenance, QTc and torsade de pointes: Who needs an electrocardiogram and what is the prevalence of QTc prolongation? *Drug Alcohol Rev*. 2010.
- Megarbane B, Decleves X, Bloch V, Bardin C, Chast F, Baud FJ. Case report: quantification of methadone-induced respiratory depression using toxicokinetic/toxicodynamic relationships. *Crit Care*. 2007;11(1):R5.
- Meineke I, Freudenthaler S, Hofmann U, Schaeffeler E, Mikus G, Schwab M, et al. Pharmacokinetic modelling of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of neurosurgical patients after short-term infusion of morphine. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54(6):592-603.
- Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*. 2005;146(6):2544-50.
- Mitchell TB, Dyer KR, Newcombe D, Salter A, Somogyi AA, Bochner F, et al. Subjective and physiological responses among racemic-methadone maintenance patients in relation to relative (S)- vs. (R)-methadone exposure. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;58(6):609-17.

- Moody DE, Alburges ME, Parker RJ, Collins JM, Strong JM. The involvement of cytochrome P450 3A4 in the N-demethylation of L-alpha-acetylmethadol (LAAM), norLAAM, and methadone. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(12):1347-53.
- Nanovskaya T, Nekhayeva I, Karunaratne N, Audus K, Hankins GD, Ahmed MS. Role of P-glycoprotein in transplacental transfer of methadone. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(12):1869-78.
- Nauck M, Stein U, von Karger S, Marz W, Wieland H. Rapid detection of the C3435T polymorphism of multidrug resistance gene 1 using fluorogenic hybridization probes. *Clin Chem.* 2000;46(12):1995-7.
- Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict.* 2001;10(3):201-17.
- Nestler EJ. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(4):210-8.
- Newton-Cheh C, Guo CY, Larson MG, Musone SL, Surti A, Camargo AL, et al. Common genetic variation in KCNH2 is associated with QT interval duration: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;116(10):1128-36.
- Noble EP. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry.* 2000;15(2):79-89.
- Nordin C, Kohli A, Beca S, Zaharia V, Grant T, Leider J, et al. Importance of hepatitis C coinfection in the development of QT prolongation in HIV-infected patients. *J Electrocardiol.* 2006;39(2):199-205.
- Oderda GM, Said Q, Evans RS, Stoddard GJ, Lloyd J, Jackson K, et al. Opioid-related adverse drug events in surgical hospitalizations: impact on costs and length of stay. *Ann Pharmacother.* 2007;41(3):400-6.
- Olsen GD. Morphine binding to human plasma proteins. *Clin Pharmacol Ther.* 1975;17(1):31-5.
- Olszewski PK, Levine AS. Central opioids and consumption of sweet tastants: when reward outweighs homeostasis. *Physiol Behav.* 2007;91(5):506-12.
- Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, Bochud M, Ansermot N, Eap CB. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(11):877-83.
- Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. Analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Lancet.* 1988;1(8589):828.
- Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. *Neuroscience.* 2005;133(1):209-20.
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK, Pasternak GW. Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(4):1057-61.
- Pasternak DA, Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pasternak GW, et al. Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy. *J Neurochem.* 2004;91(4):881-90.

Pasternak GW. Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 2001;68(19-20):2213-9.

Pattison N. Care of patients who have died. *Nurs Stand.* 2008;22(28):42-8.

Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE, Pasternak GW. Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;251(2):477-83.

Peles E, Bodner G, Kreek MJ, Rados V, Adelson M. Corrected-QT intervals as related to methadone dose and serum level in methadone maintenance treatment (MMT) patients: a cross-sectional study. *Addiction.* 2007;102(2):289-300.

Penson RT, Joel SP, Bakhshi K, Clark SJ, Langford RM, Slevin ML. Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):667-76.

Perez de los Cobos J, Baiget M, Trujols J, Sinol N, Volpini V, Banuls E, et al. Allelic and genotypic associations of DRD2 TaqI A polymorphism with heroin dependence in Spanish subjects: a case control study. *Behav Brain Funct.* 2007;3:25.

Perrin-Terrin A, Pathak A, Lapeyre-Mestre M. QT interval prolongation: prevalence, risk factors and pharmacovigilance data among methadone-treated patients in France. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011;25(4):503-10.

Petrosillo N, Lisena FP, Chinello P. QTc prolongation in human immunodeficiency virus-infected persons. *Arch Intern Med.* 2006;166(20):2288-9; author reply 9-90.

Porth CM, Gaspard KJ. *Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States.* Sixth ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.

R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Raistrick D, Hay A, Wolff K. Methadone maintenance and tuberculosis treatment. *Bmj.* 1996;313(7062):925-6.

Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, Kvam TM, Dale O, Kaasa S, et al. The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain.* 2005;116(1-2):73-8.

Rakvag TT, Ross JR, Sato H, Skorpen F, Kaasa S, Klepstad P. Genetic variation in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and morphine requirements in cancer patients with pain. *Mol Pain.* 2008;4:64.

Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, et al. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol.* 1994;45(2):330-4.

Reinsch N, Buhr C, Krings P, Kaelsch H, Neuhaus K, Wieneke H, et al. Prevalence and risk factors of prolonged QTc interval in HIV-infected patients: results of the HIV-HEART study. *HIV Clin Trials.* 2009;10(4):261-8.

Reyes-Gibby CC, Shete S, Rakvag T, Bhat SV, Skorpen F, Bruera E, et al. Exploring joint effects of genes and the clinical efficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene. *Pain.* 2007;130(1-2):25-30.

- Rodriguez M, Ortega I, Soengas I, Suarez E, Lukas JC, Calvo R. Effect of P-glycoprotein inhibition on methadone analgesia and brain distribution in the rat. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(3):367-74.
- Romach MK, Piafsky KM, Abel JG, Khouw V, Sellers EM. Methadone binding to orosomucoid (alpha 1-acid glycoprotein): determinant of free fraction in plasma. *Clin Pharmacol Ther*. 1981;29(2):211-7.
- Romberg RR, Olofsen E, Bijl H, Taschner PE, Teppema LJ, Sarton EY, et al. Polymorphism of mu-opioid receptor gene (OPRM1:c.118A>G) does not protect against opioid-induced respiratory depression despite reduced analgesic response. *Anesthesiology*. 2005;102(3):522-30.
- Ross JR, Riley J, Taegetmeyer AB, Sato H, Gretton S, du Bois RM, et al. Genetic variation and response to morphine in cancer patients: catechol-O-methyltransferase and multidrug resistance-1 gene polymorphisms are associated with central side effects. *Cancer*. 2008;112(6):1390-403.
- Schirmer M, Rosenberger A, Klein K, Kulle B, Toliat MR, Nurnberg P, et al. Sex-dependent genetic markers of CYP3A4 expression and activity in human liver microsomes. *Pharmacogenomics*. 2007;8(5):443-53.
- Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, et al. Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci*. 1999;2(2):151-6.
- Shabalina SA, Zaykin DV, Gris P, Ogurtsov AY, Gauthier J, Shibata K, et al. Expansion of the human mu-opioid receptor gene architecture: novel functional variants. *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1037-51.
- Shi J, Zhao LY, Epstein DH, Zhang XL, Lu L. Long-term methadone maintenance reduces protracted symptoms of heroin abstinence and cue-induced craving in Chinese heroin abusers. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;87(1):141-5.
- Shinderman M, Maxwell S, Brawand-Amey M, Golay KP, Baumann P, Eap CB. Cytochrome P4503A4 metabolic activity, methadone blood concentrations, and methadone doses. *Drug Alcohol Depend*. 2003;69(2):205-11.
- Sia AT, Lim Y, Lim EC, Goh RW, Law HY, Landau R, et al. A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia. *Anesthesiology*. 2008;109(3):520-6.
- Sissung TM, Gardner ER, Piekarz RL, Howden R, Chen X, Woo S, et al. Impact of ABCB1 allelic variants on QTc interval prolongation. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):937-46.
- Skarke C, Darimont J, Schmidt H, Geisslinger G, Lotsch J. Analgesic effects of morphine and morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73(1):107-21.
- Smith MT. Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(7):524-8.
- Soliman EZ, Prineas RJ, Roediger MP, Duprez DA, Boccara F, Boesecke C, et al. Prevalence and prognostic significance of ECG abnormalities in HIV-infected patients: results from the Strategies for Management of Antiretroviral Therapy study. *J Electrocardiol*. 2010.
- Sommer M, de Rijke JM, van Kleef M, Kessels AG, Peters ML, Geurts JW, et al. The prevalence of postoperative pain in a sample of 1490 surgical inpatients. *Eur J Anaesthesiol*. 2008;25(4):267-74.

- Somogyi AA, Barratt DT, Collier JK. Pharmacogenetics of opioids. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(3):429-44.
- Sporer KA. Acute heroin overdose. *Ann Intern Med.* 1999;130(7):584-90.
- Stormer E, Perloff MD, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Methadone inhibits rhodamine123 transport in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(7):954-6.
- Sutters KA, Shaw BA, Gerardi JA, Hebert D. Comparison of morphine patient-controlled analgesia with and without ketorolac for postoperative analgesia in pediatric orthopedic surgery. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 1999;28(6):351-8.
- Termorshuizen F, Krol A, Prins M, Geskus R, van den Brink W, van Ameijden EJ. Prediction of relapse to frequent heroin use and the role of methadone prescription: an analysis of the Amsterdam Cohort Study among drug users. *Drug Alcohol Depend.* 2005;79(2):231-40.
- Thompson SJ, Koszdin K, Bernards CM. Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology.* 2000;92(5):1392-9.
- Total RA, Sheffels P, Roberts T, Whittington D, Thummel K, Kharasch ED. Role of CYP2B6 in stereoselective human methadone metabolism. *Anesthesiology.* 2008;108(3):363-74.
- Tournier N, Chevillard L, Megarbane B, Pirnay S, Scherrmann JM, Decleves X. Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(7):905-15.
- Trescot AM, Helm S, Hansen H, Benyamin R, Glaser SE, Adlaka R, et al. Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines. *Pain Physician.* 2008;11(2 Suppl):S5-S62.
- Ueda H, Matsushita Y. [Anti-opioid action of glutamate-NMDA receptor systems underlying morphine analgesic tolerance]. *Masui.* 2009;58(9):1136-42.
- van den Wildenberg E, Wiers RW, Dessers J, Janssen RG, Lambrichs EH, Smeets HJ, et al. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) influences cue-induced craving for alcohol in male heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(1):1-10.
- Vandenbergh DJ, Rodriguez LA, Miller IT, Uhl GR, Lachman HM. High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers. *Am J Med Genet.* 1997;74(4):439-42.
- Vazquez V, Gury C, Laqueille X. [Methadone: from pharmacokinetic profile to clinical pharmacology]. *Encephale.* 2006;32(4 Pt 1):478-86.
- Vella-Brincat J, Macleod AD. Adverse effects of opioids on the central nervous systems of palliative care patients. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2007;21(1):15-25.
- Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S. Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. *J Neurosci.* 2003;23(5):1879-85.
- Villeneuve JP, L'Ecuyer L, De Maeght S, Bannion P. Prediction of cyclosporine clearance in liver transplant recipients by the use of midazolam as a cytochrome P450 3A probe. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67(3):242-8.

- Wahlstrom A, Lenhammar L, Ask B, Rane A. Tricyclic antidepressants inhibit opioid receptor binding in human brain and hepatic morphine glucuronidation. *Pharmacol Toxicol*. 1994;75(1):23-7.
- Waldschmitt C, Vogel F, Maurer C, Hiemke C. Measurement of duloxetine in blood using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection and column switching. *Ther Drug Monit*. 2007;29(6):767-72.
- Waldschmitt C, Vogel F, Pfuhlmann B, Hiemke C. Duloxetine serum concentrations and clinical effects. Data from a therapeutic drug monitoring (TDM) survey. *Pharmacopsychiatry*. 2009;42(5):189-93.
- Walker PW, Klein D, Kasza L. High dose methadone and ventricular arrhythmias: a report of three cases. *Pain*. 2003;103(3):321-4.
- Walter C, Lotsch J. Meta-analysis of the relevance of the OPRM1 118A>G genetic variant for pain treatment. *Pain*. 2009;146(3):270-5.
- Wandel C, Kim R, Wood M, Wood A. Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. *Anesthesiology*. 2002;96(4):913-20.
- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):693-704.
- Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *Aaps J*. 2006;8(3):E515-20.
- Wang JS, DeVane CL. Involvement of CYP3A4, CYP2C8, and CYP2D6 in the metabolism of (R)- and (S)-methadone in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(6):742-7.
- Wang JS, Ruan Y, Taylor RM, Donovan JL, Markowitz JS, DeVane CL. Brain penetration of methadone (R)- and (S)-enantiomers is greatly increased by P-glycoprotein deficiency in the blood-brain barrier of Abcb1a gene knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;173(1-2):132-8.
- Weber I, Ulmer A, Lang A, Zerdick J. [Initial effects of the 1998 revised narcotic law in substitute drug treatment of narcotic dependent patients--results of a physician survey]. *Gesundheitswesen*. 2000;62(1):21-4.
- Wolff K, Hay AW, Raistrick D, Calvert R. Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts. *Eur J Clin Pharmacol*. 1993;44(2):189-94.
- Wood JD, Galligan JJ. Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16 Suppl 2:17-28.
- Wu CL, Raja SN. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet*. 2011;377(9784):2215-25.
- Wu HL, Tsou MY, Chao PW, Lin SM, Chan KH, Chang KY. Evaluation of the relationships between intravenous patient-controlled analgesia settings and morphine requirements among patients after lumbar spine surgery. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2011;48(2):75-9.
- Xi ZX, Stein EA. GABAergic mechanisms of opiate reinforcement. *Alcohol Alcohol*. 2002;37(5):485-94.
- Xie R, Hammarlund-Udenaes M, de Boer AG, de Lange EC. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a* (-/-) and *mdr1a* (+/+) mice. *Br J Pharmacol*. 1999;128(3):563-8.

Young GB, da Silva OP. Effects of morphine on the electroencephalograms of neonates: a prospective, observational study. *Clin Neurophysiol.* 2000;111(11):1955-60.

Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, et al. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet.* 2001;68(2):515-22.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature.* 1997;386(6624):499-502.

Zaslansky R, Hertz D, Brill S, Or J, Meissner W, Halpern P. Tracking the effects of policy changes in prescribing analgesics in one emergency department: a 10-year analysis. *Eur J Emerg Med.* 2011;17(1):56-8.

Zhang Y, Post WS, Dalal D, Blasco-Colmenares E, Tomaselli GF, Guallar E. Coffee, alcohol, smoking, physical activity and QT interval duration: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One.* 2011;6(2):e17584.

Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32618-24.

Zhu B, Liu ZQ, Chen GL, Chen XP, Ou-Yang DS, Wang LS, et al. The distribution and gender difference of CYP3A activity in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;55(3):264-9.

Zong J, Pollack GM. Morphine antinociception is enhanced in *mdr1a* gene-deficient mice. *Pharm Res.* 2000;17(6):749-53.

Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science.* 2003;299(5610):1240-3.

<http://www.afssaps.fr>

[http://www.afssaps.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-sous-surveillance-renforcee/\(offset\)/0](http://www.afssaps.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-sous-surveillance-renforcee/(offset)/0)

<http://www.cia.gov>

<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.theriaque.org>

<http://www.torsades.org>

ANNEXES

ANNEXE 1:

Fiches d'évaluation du projet Pharm-MPO-09 « **Facteurs génétiques associés à la réponse à la morphine en période postopératoire** ».

- ▶ Annexe 1.a : Fiche d'inclusion
- ▶ Annexe 1.b : Fiche de suivi postopératoire.

ANNEXE 2:

Liste des amorces et sondes (Génotypage Lightcycler Roche).

ANNEXE 3:

Liste des amorces (Séquençage *OPRM1*).

ANNEXE 4:

Hajj A, Peoc'h K, Ksouda K, Vorspan F, Callebert J, Declèves X, Lepine JP, Scherrmann JM, Rabbaa-Khabbaz L, Laplanche JL, **How to obtain DNA from injection drug users?**, *Clin Chem Lab Med.* 2011 49(8):1391-2.

ANNEXE 5:

F Vorspan, K Ksouda, V Bloch, JL Laplanche, K Peoc'h, **A Hajj**, et al. **A case report of transient but clinically relevant interaction between methadone and duloxetine: a reply to McCance-Katz et al.** *Am J Addict.* 2010;19(5):458-9.

FICHE D'INCLUSION

Etiquette du patient	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div><i>Date</i> :</div><div><i>Heure</i> :</div></div> <div><i>Prescripteur</i> :</div> <div><i>Préleveur</i> :</div> <div><i>Site de prélèvement</i> :</div>
----------------------	--

Protocole Pharmacogénétique de la Morphine en post-opératoire
Pharm/MPO/09

Numéro d'anonymat :

MPO/09 puis numéro d'identifiant (3 chiffres ex -001)

MPO/09

Recueil des données :

- Poids :
- Taille :
- Créatinine (Clearance ou plasmatique) :
- Type de chirurgie prévue :

Médicaments impliquant la non-inclusion des patients dans l'étude	Prises médicamenteuses à domicile : prise journalière régulière pour plus de 1 semaine	
	Médicaments à effet notoire :	Autres :
<input type="checkbox"/> Morphine : Autres opiacés : <input type="checkbox"/> Tramal <input type="checkbox"/> Zaldiar <input type="checkbox"/> Autres	<input type="checkbox"/> Benzodiazépines : <input type="checkbox"/> Antidépresseurs (spécifier):.....

←-----

EN CAS DE PROBLEME, INFORMER Pr. LYDIA KHABBAZ RABBA,

Dr. ALINE HAJJ ou FABIENNE HAJJ MOUSSA au 01. 421000 ext. 2170



HOTEL-DIEU DE FRANCE
Centre Hospitalier - Universitaire

Département d'Anesthésie - Réanimation

Protocole Pharmacogénétique de la Morphine en post-opératoire

Pharm/MPO/09

Numéro d'anonymat :
MPO/09 puis numéro d'identifiant (3 chiffres ex -001)

MPO/09



Laboratoire de Pharmacologie Clinique
et Pharmacocinétique

FICHE DE SURVEILLANCE POST-ANALGESIQUE

Etiquette

Age :	Date :	Durée oper :	min :
Poids :	Chirurgien :	Fenta total :	mg :
Taille :	Opération :		
Sexe : F M		Durée salle de réveil :	min :

	T ₀ (extubation)	T ₁	T ₃	T ₆	T ₁₂	T ₂₄	T ₃₆	T ₄₈	
Anxiété : EVA (0-10)									1 ^{ère} boisson à :
Douleur (satisfaction) : EVA repos (0-10)									
Douleur (satisfaction): EVA movt(0-10)									
Sédation (0-3)									1 ^{ère} alimentation à :
Intensité des nausées (0-3)*									
Vertige/ Confusion (O-N)									
Rythme respir/min									
Dépression respiratoire (O-N)									
Globe vesical (O-N)									
Constipation (O-N)									
Sondage vesical (O-N)									
Bruits intest (O-N)									
Hypo TA < 100 (O-N)									
Bradycardie < 50(O-N)									
Morphine (mg) PCA									

*0: Pas de Nausées

1: Nausées légères

2: Nausées modérées

3 : Nausées sévères, vomissements nécessitant la prise d'antiémétiques

Nom et Signature du médecin responsable de l'évaluation:

ANNEXE 2:

Liste des amorces et sondes utilisées pour le génotypage par PCR en temps réel sur Lighcyler des SNPs d'*OPRM1*, *COMT* et *ABCB1*.

<i>OPRM1</i> c.118A>G (rs 179997)			
	Séquences	Tm	Référence
Amorce Sens	5'-GCTTGGAACCCGAAAAGT-3'	57.6°C	Grösch 2001
Amorce Antisens	5'-GTAGAGGGCCATGATCGTGA-3'	56.5°C	Grösch 2001
Sonde d'ancrage	CCCGGTTCTGGGTCAACTTGTC-FL	69.1°C	Grösch 2001
Sonde d'hybridation	640- CTTAGATGGCAACCTGTCCGACC-PH	62.9°C	Grösch 2001

<i>COMT</i> p.Val158Met (rs 4680)			
	Séquences	Tm	Référence
Amorce Sens	5'-GGGCCTACTGTGGCTACTCA-3'	64.0°C	-
Amorce Antisens	5'- GGCCCTTTTCCAGGTCTG -3'	60.0°C	-
Sonde d'ancrage	5'- TCACGCCAGCGAAATCCA- FL	60.0°C	Rakvag 2005
Sonde d'hybridation	5'-LC640- ATCCGCTGGGTGATGGCG-PH	61.8°C	Rakvag 2005

<i>ABCB1</i> c.3435C>T (rs 104564)			
	Séquences	Tm	Référence
Amorce Sens	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3'	55.9°C	Nauck 2000
Amorce Antisens	5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'	56.3°C	Nauck 2000
Sonde d'ancrage	GACAACAGCCGGGTGGTGTCA-FL	65.1°C	Nauck 2000
Sonde d'hybridation	640- GGAAGAGATCGTGAGGGCAG-PH	59.4°C	Nauck 2000

Abréviations : Tm ; *Melting temperature* ou température de fusion.

Liste des amorces utilisées pour les PCR et séquençage des exons d'*OPRM1*.

	Séquences des amorces	Température d'hybridation
huMOR1ex1_s	GCTTGGAACCCGAAAAGTCT	56°C
huMOR1ex1_as	CCCTTAAGCCGCTGAAC	
huMOR1ex2_s	TCATGCAAATTTATTATTGGAAGC	57°C
huMOR1ex2_as	ACAATGGGGCACTCCATAAA	
huMOR1ex3.1_s	TGTTGCTGCTAATTTTTCCTTT	57°C
huMOR1ex3.1_as	CCAAGGCTTTAATGATGACG	
huMOR1ex3.2_s	TCTGGCTCAAAGAAAAGGA	57°C
huMOR1ex3.2_as	AATTTTATGTCATCCCCAGTAGA	
huMOR1ex4_s	CAGTACAGTGACGACCCCTTC	60°C
huMOR1ex4_as	GGCTTTGCATAAATCTTGGTG	
huMOR1ex4bis_s	CGAGCAGAAGATGCTCAACA	60°C
huMOR1ex4bis_as	GGTGGCTTCTAAGCTTGGTG	

Letter to the Editor

How to obtain DNA from injection drug users?

Aline Hajj¹⁻³, Katell Peoc'h^{1,2,*}, Kamilia Ksouda^{2,4}, Florence Vorspan^{2,4}, Jacques Callebert^{1,2}, Xavier Declèves², Jean-Pierre Lepine^{2,4}, Jean-Michel Scherrmann², Lydia Rabbaa-Khabbaz³ and Jean-Louis Laplanche^{1,2}

¹ Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, Paris, France, and Paris-Cité Descartes University (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques), Paris, France

² INSERM U705, CNRS UMR8206:

Neuropsychopharmacologie des Addictions: vulnérabilité et variabilité expérimentale et clinique, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France

³ Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Pharmacocinétique, Faculté de Pharmacie, Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban

⁴ Service de Psychiatrie, Hôpital Fernand Widal, Paris, France

Keywords: addiction; buccal cells; DNA; single nucleotide polymorphism.

Genomic studies are needed to identify gene polymorphisms (SNPs, single nucleotide polymorphisms) associated with drug abuse and dependence that can explain inter-individual variability in response to substitution drugs (1). However, blood is sometimes difficult to obtain from injection drug users, partly due to the vascular damage caused by injections. An alternative way to obtain DNA would be to collect buccal cells using swabs, a technical means that has been successfully used in numerous clinical settings and epidemiological studies (2–4). However, buccal cell collection could be plagued by difficulties in poly-substance abusers due to oral dryness (xerostomia), poor oral health and sometimes the presence of lesions in the buccal mucosa due to malnutrition and HIV infection (5, 6). Moreover, xerostomia is a known side-effect of methadone treatment in opioid dependency (7). This pilot

study was carried out to test the suitability of buccal cell collection for providing DNA in opiate addict patients treated with methadone before launching a large-scale genotyping study.

Buccal cells from 10 healthy volunteers and 20 heroin addict patients reluctant to undergo venipuncture were collected using the “Indicating” FTA cards (Whatman, Maidstone, UK) according to the manufacturer’s instructions. The study was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from all participants. Briefly, buccal cells were collected using a non-invasive sterile foam tipped applicator and then applied onto cards. Physicians declared that the collection technique was simple although they confirmed some difficulties due to the oral dryness in patients. Most of the patients were compliant and preferred buccal cell collection than providing blood samples.

The cards were air-dried for 2 h and then conserved in a bag with desiccant at room temperature. DNA was used either directly as dry punches (3 mm diameter circle discs) as recommended by the manufacturer or after elution using the following protocol. Briefly, 3 mm diameter circle discs were punched from the FTA indicating card and rinsed twice by pulse-vortexing in 500 µL of distilled sterile water. Single rinsed discs were transferred into 30 µL of sterile water then heated to 95°C for 30 min. This protocol allowed us to evaluate the DNA quantity present on the punches. DNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop®, Wilmington, NC, USA). DNA was obtained in all addicts with yields ranging from 204 to 648 ng/punch (median: 336 ng/punch) vs. 123–636 ng/punch (median: 345 ng/punch) in controls ($p = \text{NS}$). As the mean estimated DNA quantity obtained per card was 14 µg (corresponding to 40 punches per card), it appears that around 1000 genotyping reactions could be conducted per single DNA sample. No significant decrease in DNA quality was observed after at least 2 years at room temperature.

Dry punches or eluted DNA from buccal cells were used for genotyping two SNPs in the Opioid mu receptor gene (*OPRM1*; c.118A>G, rs1799971) and the P-glycoprotein gene (*ABCB1*; c.3435C>T, rs1045642) using Real-Time PCR assays (Taqman, Applied Biosystems and Lightcycler, Roche) or denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC). Direct sequencing was also tested (c.3435C>T of *ABCB1*). Positive controls for the two SNPs were obtained by direct sequencing of blood DNA.

DNA samples from 100% of the FTA punches were successfully genotyped at all loci using Real-Time PCR assays. No discrepancy was observed between blood DNA from healthy controls and DNA from FTA cards (Figure 1). Either

*Corresponding author: Katell Peoc'h, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, 2 rue A. Paré, 75475 Paris Cedex 10, France
Phone: +33 1 49956434, E-mail: Katell.peoch@lrb.aphp.fr

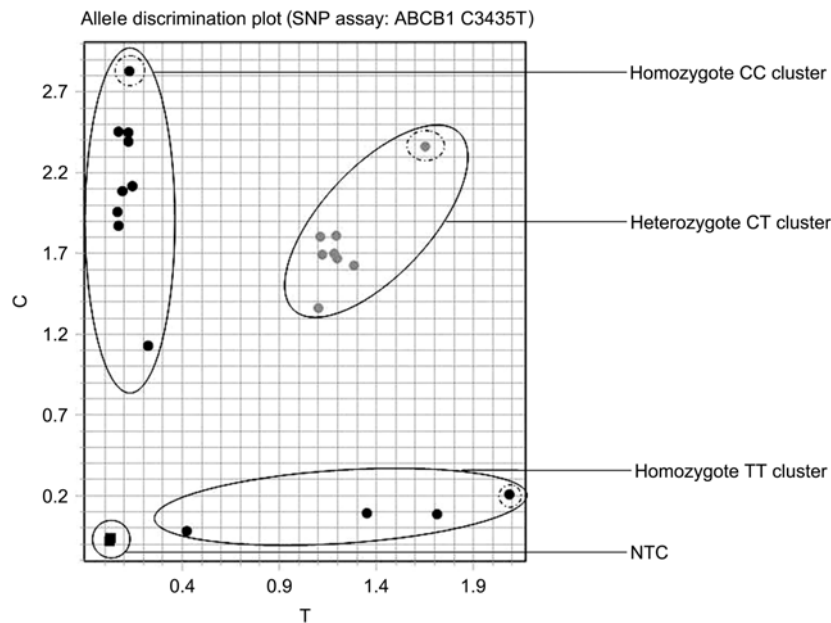


Figure 1 A typical allelic discrimination plot for Taqman® *ABCB1* c.3435C>T genotyping assay on step one plus, displaying three clusters corresponding to the three genotypes and, near the origin, the no template controls (NTC). The samples with a dashed circle correspond to the amplified genomic blood DNA controls whereas the other samples to DNA from patients' FTA cards.

dry punches or eluted DNA were tested using dHPLC and sequencing. dHPLC exhibited a 100% rate of genotyping success. In contrast to previous results (2), direct sequencing of *ABCB1* was successful. One hundred percent concordance was attained for all successful genotyping of DNA samples between conventional PCR and Real-Time PCR.

We conclude that buccal cell collection is an efficient alternative to venipuncture to obtain DNA from addicted patients. It is well tolerated by patients often affected with altered oral mucosa and could be used to provide DNA with good yield and suitability in large-scale studies using different molecular genotyping techniques. In addition, it resolves the problem of low participation rates of the patients who are often forced to get to the collection site to give blood samples.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann NY Acad Sci* 2010;1187:184–207.
2. Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:2072–6.
3. Mulot C, Stücker I, Clavel J, Beaune P, Lorient MA. Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *J Biomed Biotechnol* 2005;3:291–6.
4. Beckett SM, Laughton SJ, Pozza LD, McCowage GB, Marshall G, Cohn RJ, et al. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiologic studies examining pediatric populations. *Am J Epidemiol* 2008;167:1260–7.
5. McGrath C, Chan B. Oral health sensations associated with illicit drug abuse. *Br Dent J* 2005;198:159–62.
6. Blondin D, Crawford RI, Kerr T, Zhang R, Tyndall MW, Montaner JS, et al. Dermatologic manifestations of underlying infectious disease among illicit injection-drug users. *J Cutan Med Surg* 2008;12:71–6.
7. Graham CH, Meechan JG. Dental management of patients taking methadone. *Dent Update* 2005;32:477–8, 481–2, 485.

A Case Report of Transient but Clinically Relevant Interaction between Methadone and Duloxetine: A Reply to McCance-Katz et al.

Florence Vorspan, MD, MSc,^{1,2} Kamilia Ksouda, MD, MSc,^{1,2} Vanessa Bloch, PharmD, PhD,^{1,2} Jean-Louis Laplanche, PharmD, PhD,^{1,3} Katell Peoc'h, PharmD, PhD,^{1,3} Aline Hajj, PharmD,^{1,3} Jean-Michel Scherrmann, PharmD, PhD,¹ Stéphane Mouly, MD, PhD,^{1,4} Jean-Pierre Lépine, MD^{1,2}

¹Neuropsychopharmacologie des Addictions, Université Paris Descartes et Paris Diderot, hôpital Fernand Widai, Paris, France

²Service de psychiatrie, hôpital Fernand Widai, Paris, France

³Laboratoire de Biochimie A, hôpital Lariboisière AP-HP, Paris, France

⁴Service de Médecine Interne A, hôpital Lariboisière, Paris, France

McCance-Katz et al. reviewed drug interactions of clinical importance among methadone and other frequently prescribed medications.¹ Regarding duloxetine, they noticed that association with methadone may theoretically lead to increased duloxetine exposure. But to date, this interaction has not been reported in human subjects. This is why we report this clinically relevant case of interaction.

A 37-year-old patient under treatment for heroin dependence had been treated since 2001 with a stable daily dosage of 50 mg per day of methadone. He was started on duloxetine 60 mg per day in March 2009 for a depressive episode.

His other treatments remained unchanged during this period of time. He was regularly prescribed diazepam, cyamemazine, biperidene, and alimemazine. At the time of duloxetine challenge, he was abstinent from heroin, cocaine, and alcohol use, as attested by urine samples. A few days after duloxetine was started, he complained about subjective signs of opioid overdose: sweating, drowsiness, fatigability, and pruritus. These signs remained minor and did not result in impairment of vital signs. The hepatic blood tests remained unchanged. Furthermore, no electrocardiography modification could be seen in this patient who already had a corrected QT interval prolongation (47 ms). These clinical signs remained the same for the next 14

days. Because the patient's depressive symptoms improved, and because these side effects remained moderate, the risk-benefit balance favored keeping the duloxetine at 60 mg per day. After 2 weeks we decided to lower methadone dosage to 40 mg per day. This 20% decrease in the oral dosage led to an immediate improvement in opioid overdose signs. The duloxetine remained effective to treat the depressive episode. After 2 months, the patient did not describe any more opioid overdose signs, and methadone was increased back at his usual dosage of 50 mg per day. During this rechallenge, the patient did not experience any side effects, suggesting a tolerance phenomenon.

McCance-Katz et al.,¹ as well as other authors,² suggested that this interaction would be mediated by a competitive inhibition at the cytochrome P450 (CYP) 2D6 level. The few days delay for the interaction to occur is the time needed for the steady state of duloxetine to occur (3–5 days theoretically). The tolerance effect 2 months after to the interaction between duloxetine and methadone suggests that chronic administration of duloxetine and methadone may induce either the CYP 2D6 activity or another CYP function.

For duloxetine, some previously reported interactions with anticoagulants (acenocoumarol and warfarin) already suggested a competitive inhibition by duloxetine of CYP 2D6 or CYP 1A2, or eventually CYP 2C9.³ These case reports were confirmed by in vitro models and healthy volunteers' studies.⁴

A limitation of this case report is that duloxetine and methadone plasma levels were not measured in this patient. But, we knew from previous genotyping that this patient was not an ultra-rapid CYP 2D6 metabolizer.

Received February 24, 2010; accepted February 25, 2010.

Address correspondence to Dr. Vorspan, Neuropsychopharmacologie des Addictions, INSERM U705, CNRS UMR 8206, Université Paris Descartes et Paris Diderot, hôpital Fernand Widai, AP-HP, 200 rue du Faubourg Saint Denis 75475 Paris cedex 10, France. E-mail: florence.vorspan@lrb.aphp.fr.

Furthermore, we cannot rule out that the interaction between methadone and duloxetine in this patient occurred at another level: absorption, blood-brain barrier transport, and another liver disposition enzyme. An interaction at the level of P-glycoprotein transport (P-gp), either at the intestinal or blood-brain barrier level, should especially be kept in mind. We know that methadone is a substrate of P-gp⁵ and that duloxetine may be transported too, given its between-subject variability as far as bioavailability is concerned (32–80 hours), its molecular weight (333.88 g/mol, knowing that P-gp is in charge of the transport of molecules with a molecular weight from 240 to 4,000), and retarded maximum concentration occurring 6 hours after oral intake.

Methadone and duloxetine co-prescription may result in a transient but clinically significant increase in methadone effects. Clinicians should be aware that these patients should be closely monitored during the first few days of treatment and methadone dosage reevaluated after several weeks of this co-prescription.

Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. McCance-Katz EF, Sullivan LE, Nallani S. Drug interactions of clinical importance among the opioids, methadone and buprenorphine, and other frequently prescribed medications: A review. *Am J Addict.* 2010;19:4–16.
2. Weschules DJ, Brain KT, Richeimer S. Actual and potential drug interactions associated with methadone. *Pain Med.* 2008;9:315–344.
3. Monastero R, Camarda R, Camarda C. Potential drug-drug interaction between duloxetine and acenocoumarol in a patient with Alzheimer's disease. *Clin Ther.* 2007;29:2706–2709.
4. Lobo E, Bergstrom R, Reddy S, et al. In vitro and in vivo evaluations of cytochrome P450 1A2 interactions with duloxetine. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47:191–202.
5. Tournier N, Chevillard L, Megarbane B, et al. Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;4:1–11.